

**Zur Chemie der Inhaltsstoffe der Pelargonium
reniforme Curt.-Wurzel (Umckaloabo)**

Sabine Bladt

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554607_0057

Zur Chemie der Inhaltsstoffe der Pelargonium

reniforme Curt.-Wurzel (Umckaloabo)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Sabine Blatt

aus

München

Juli 1974



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r
 2. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r
- Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1974

Für die wertvollen Anregungen und das stets gezeigte große Interesse an der Arbeit möchte ich ganz besonders Herrn Professor Dr. H. Wagner danken.

Herrn Professor Dr. D. Roux bin ich für die Einladung und den damit ermöglichten Aufenthalt an seinem Institut zu großem Dank verpflichtet.

Ferner danke ich Herrn Professor D. Abraham, Herrn Dr. H. Lotter und Herrn O. Seligmann für die Aufnahmen, Diskussion und Auswertung von Spektren.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	3
A. Klärung der botanischen Identität der UMCKALOABO-Droge	3
I. Mikroskopie	3
II. Vergleich der Umckaloabo-Droge mit anderen Gerbstoff- drogen	5
III. Ethnobotanische und medikologische Studien	7
IV. Hinweis auf die Identität der Umcka-Droge	11
B. Chromatographische Untersuchungen südafrikanischer Pelargoniumarten	13
I. Herkunft und Beschreibung	13
II. Bisherige Kenntnisse über Pelargoniumarten	13
III. Volksmedizinische Anwendungen	14
IV. Orientierende Voruntersuchungen	16
C. Untersuchung über die Inhaltsstoffe von PELARGONIUM RENIFORME Curt.-Wurzeln	21
I. Vorproben	21
II. Isolierungen	26
1. Isolierung von Substanz 2	28
2. Strukturaufklärung von Substanz 2	30
a) Chromatographisches Verhalten	32
b) Fluoreszenzverhalten	33
c) UV-Spektroskopie	35
d) IR-Spektroskopie	37
e) Massenspektroskopie	39
f) NMR-Spektroskopie	48
g) Synthese des 5,6,7-Trimethoxycumarins	56
h) Entmethylierung	60
i) Röntgenstrukturanalyse	60
3. Identifizierung von Umckalinmonomethyläther	64
4. Isolierung und Identifizierung von Substanz 3	66
5. Isolierung und Identifizierung von Substanz 6	67
6. Identifizierung eines 7-O-Glucosides des Umckalins	67
a) Isolierungsversuch	67
b) Synthese	68

7. Versuche zur Charakterisierung von Substanz 5 . . .	73
8. Isolierung bzw. chromatographische Identifizierung von Kaffeesäure, Chlorogensäure, p-Cumarsäure, Pro- tokatechusäure und Phloroglucin	74
9. Isolierung und Identifizierung von Quercetin und Kämpferol	76
10. Untersuchung des Gerbstoffanteils der Pelargonium- wurzeln	76
a) Identifizierung der Katechine	76
b) Untersuchung der Leukoanthocyanidine	78
c) Gehaltsbestimmung der Tannine	81
d) Untersuchungen der kondensierten Tannine	82
11. Isolierung und Identifizierung biogener Amine und Aminosäuren	82
12. Isolierung und Identifizierung der Sterine	88
13. Untersuchung auf weitere Lipide einschl.d.Fettsr.	89
D. Pharmakologische und bakteriologische Untersuchungen .	92
I. Bisherige Kenntnisse	92
II. Eigene Arbeiten	93
1. Toxizitätsprüfung	93
2. Bakteriologische Untersuchungen	95
Diskussion der bakteriologischen und pharmakologischen Untersuchungen	103
Zusammenfassung	105
EXPERIMENTELLER TEIL	107
A. Herkunft der Drogen	107
B. Allgemeine Arbeitsmethoden	108
I. Papierchromatographie	108
II. Kieselgel-Dünnschichtchromatographie	109
III. Cellulose-Dünnschichtchromatographie	110
IV. Polyamid-Dünnschichtchromatographie	110
V. Sprühreagenzien	111
VI. Präparative Chromatographie	112
1. Kieselgelsäulen	112
2. Polyamidsäulen	112
3. Dünnschichtchromatographie	112
4. Gaschromatographie	112
5. Aminosäureanalyse	112
6. Ionenaustauschchromatographie	113

V. Allgemeine physikalische Untersuchungsmethoden . . .	113
1. Schmelzpunkte	113
2. UV-Spektren	113
3. IR-Spektren	113
4. NMR-Spektren	114
5. Massenspektren	114
6. Röntgenstrukturanalyse	114
VI. Allgemeine Vorprüfungen	114
1. Prüfung auf Alkaloide	114
2. Prüfung auf Glykoside	115
3. Prüfung auf Gerbstoffe	115
VII. Darstellung von Derivaten	116
VIII. Chemische Reaktionen	116
C. Bereitung der Drogenextrakte	117
D. Strukturaufklärung von Substanz 2	118
E. Strukturaufklärung von Substanz 4	124
F. Strukturaufklärung von Substanz 3 und Substanz 6 . . .	128
G. Identifizierung der Säuren	129
H. Isolierung und Identifizierung der Flavone	133
I. Aufklärung des Gerbstoff-Anteils	134
I. Abtrennung und Gehaltsbestimmung	134
II. Hydrolyse zur Charakterisierung der Leucoanthocyani- dine	136
III. Spaltung der kondensierten Tannine	137
J. Aufklärung der biogenen Amine	138
K. Klärung der Sterine	140
L. Klärung weiterer Lipide einschließlich der Fettsäuren	141
M. Veraschung und Untersuchung der Aschebestandteile . . .	142
N. Pharmakologische Untersuchungen	143
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	144

E I N L E I T U N G

Unter der Bezeichnung "Umckaloabo" wurde in Merck's "Index of Chemicals and Drugs" 1961 eine Droge aufgeführt, die als Tuberkulosemittel Verwendung findet.

Sie wird in Form der Umckaloabo-Stevenskur von einer pharmazeutischen Firma^{*)} zur Tuberkulose-Prophylaxe und Therapie in den Handel gebracht.

Bei der Droge handelt es sich um die Wurzelrinde einer südafrikanischen Pflanze, deren botanische Identität zu Beginn der Untersuchungen nicht feststand. Das Wachstumsgebiet wird zwischen Port Elisabeth am Indischen Ozean und dem unabhängigen Staat Lesotho 300 km nördlicher angegeben.

Der Engländer CH.H.STEVENS brachte diese Pflanze im Jahre 1897 nach England, nachdem er selbst mit diesem Mittel durch einen Eingeborenen von einer schweren Lungentuberkulose geheilt worden war. Auf Grund dieses Erfolges führte er die Droge in verschiedenen Arzneiformen in die Therapie ein.

Wegen der zufälligen Ähnlichkeit der Umckadroge mit bekannten Gerbstoffdrogen, wie Krameria triandra Ruiz et Pav. und Pterocarpus marsupium Roxb., mußte er sich einige Jahre später vor der britischen medizinischen Gesellschaft einem Verhör unterziehen, in dem man ihn des Betruges bezichtigte. Das Protokoll dieses Verhöres ist in einem 80seitigem Heft veröffentlicht¹⁾.

Aus den dort gemachten Angaben geht hervor, daß die Umcka-Droge eine spezifische, den Heilungsvorgang fördernde Wirkung ausüben und in vielen fast hoffnungslosen Fällen eine spontane Heilung herbeiführen soll. STEVENS konnte jedoch über das wirksame Prinzip der Droge keine näheren Angaben machen.

In der Folgezeit beschäftigte sich A.SECHEHAYE von der Universität Genf mit der inneren Behandlung der Tuberkulose durch die Umckadroge. Auch er kommt in seinen Abhandlungen^{2,3,4)} zu dem Ergebnis, daß in vielen Fällen von chirurgischer und pulmonaler

*) ISO-Werk Regensburg

Tuberkulose mit Ausnahme akuter, bösartiger und komplizierter Fälle eine deutliche Heilwirkung durch die Droge feststellbar war.

Die Wirkungsweise soll dabei vor allem in einer "Neutralisierung oder einer Vernichtung der tuberkulösen Gifte" und weniger in einer direkten bakteriziden Wirkung bestehen. Eine Zusammenfassung der wesentlichen Merkmale dieser beschriebenen Heilwirkung wird von W.von BOJANOWSKI⁵⁾ gegeben.

Trotz dieser immerhin sehr beeindruckenden therapeutischen Erfolge existieren bis heute keine Arbeiten, in denen versucht worden wäre, das wirksame Prinzip der Droge zu ermitteln. Die wenigen, in der Literatur aufgeführten Angaben über die "chemische Zusammensetzung" beschränken sich auf die Angaben von Asche-Bestandteilen und Farbreaktionen, die die Droge mit einigen Reagenzien gibt.

Da Angaben über die botanische Identität zu Beginn der Untersuchungen fehlten und die Droge nur unter dem Namen UMCKALOABO geführt wurde, war es vor Beginn der chemischen Arbeiten erforderlich, diese Frage zu klären.

ALLGEMEINER TEIL

A. Klärung der botanischen Identität der UMCKALOABO-Droge

I. Mikroskopie

Das mikroskopische Bild des braun gefärbten Pulvers läßt typische Bestandteile einer Wurzelrinde erkennen. Es finden sich reichlich Bastfasern, Gefäßbruchstücke, stärkehaltiges Rindenparenchym und Steinzellen. Auffallend war bei der vorliegenden Probe die große Zahl von Oxalatdrusen, die in Form und Größe an die des Rhabarberhizoms erinnerten. Auch die Untersuchung eines ganzen Rindenstückes *) spricht eindeutig für ein durch sekundäres Dickenwachstum erstarktes Wurzelstück einer dicotylen Pflanze.

Der Querschnitt zeigt von außen nach innen Kork, primäres Rindenparenchym mit Steinzellennestern und Bastfasern, Kambium und zerstreutporiges Xylem mit mehreren Zellagen breiten Markstrahlen, die reichlich Oxalatdrusen und Gerbstoffeinlagerungen zeigen.

Im Längsschnitt lassen sich Netzgefäße und langgestreckte Bastfasern erkennen (siehe Abb. 1).

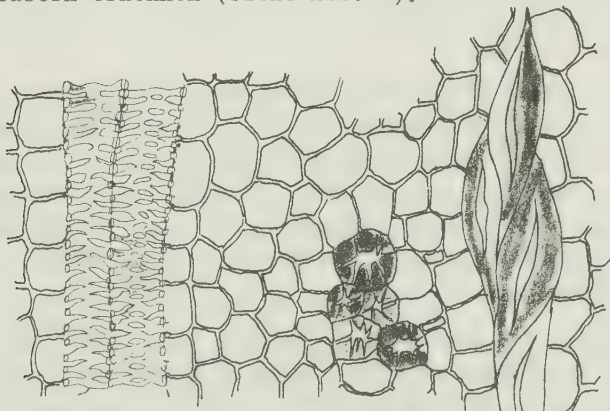


Abb. 1

*) vom ISO-Werk Regensburg zur Verfügung gestellt.

Eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Aufbau von Radix Rhei ist keineswegs auszuschließen, wie folgende Merkmale des Pulvers zeigen:

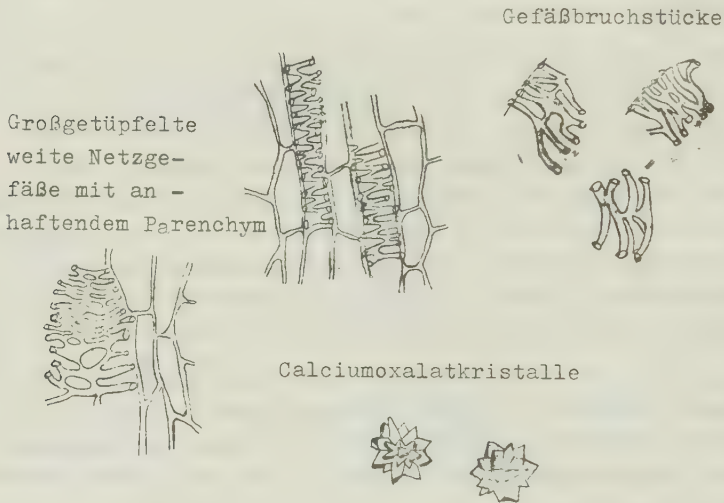


Abb. 2

Zusammenfassend geht aus diesen Untersuchungen nur hervor, daß die häufigen Einlagerungen von Steinzellen und Bastfasern in der primären Rinde auf ein sekundäres Dickenwachstum verbunden mit Dilation, somit auf eine Wurzel, hinweisen. Die starke Braunfärbung des Rinden- und Markstrahlparenchyms ist auf Gerbstoffe zurückzuführen, die z.T. in Glycerin löslich sind.

Das Phloem ist meist völlig zerdrückt und nicht mehr nachweisbar. An einigen Stellen finden sich zwischen primärer Rinde und Xylem Kambium-ähnliche verdickte Zellen, die wohl als Rest eines Kambiums aufzufassen sind.

II. Vergleich der Umckaloabo-Droge mit anderen Gerbstoffdrogen

Eine Verfälschung mit der Wurzelrinde von *Krameria triandra* Ruiz et Pav. (*Radix Ratanhiae*) und dem Kinoharz von *Pterocarpus marsupium* Roxb., wie sie in der Literatur angegeben wurde, ist schon deshalb unwahrscheinlich, da diese beiden Drogen nicht in Südafrika heimisch sind. Zwar schmeckt *Radix Ratanhiae* wie alle Gerbstoffdrogen auf Grund eines hohen Gerbstoffgehaltes stark zusammenziehend, jedoch schließt ein chromatographischer Vergleich der methanolischen Auszüge eine Identität vollständig aus (siehe Abb. 3, S. 6).

Beim Betrachten im langwelligen UV-Licht sind die stark blauen Fluoreszenzzonen der Umckaloabo-Droge über das ganze Chromatogrammbild verteilt. Demgegenüber findet man bei *Radix Ratanhiae* nur wenige, meist rötlichbraun fluoreszierende Zonen.

Andere einheimische Gerbstoffdrogen, wie *Radix Tormentillae* (*Potentilla erecta* (L.) Raeusch) oder *Radix Bistortae* (*Polygonum bistorta* L.) mit Oxalatdrusen, ähnlich denen von *Radix Rhei* (*Rheum palmatum* L.) geben unter den angegebenen Extraktions- und Chromatographiebedingungen keine charakteristischen chromatographischen Bilder (Abb. 3, S. 6).

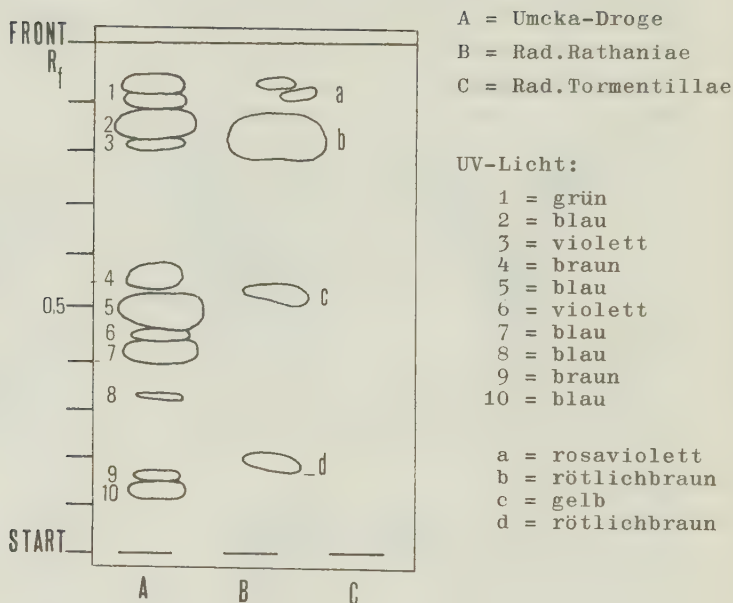


Abb. 3

Dünnschichtchromatographischer Vergleich der methanolischen Extrakte auf Kieselgel in BEW (4:1:2) nach Betrachten im UV-366 nm

Kinoharz scheidet ohnehin aus, da hier im mikroskopischen Bild völlig andere Strukturelemente vorliegen.

Anhand dieser Untersuchungen scheint es bewiesen, daß die Umkaloabo-Droge keine Identität mit den angegebenen Drogen haben kann.

III. Ethnobotanische und medikologische Studien

Eine weitere Möglichkeit zur Klärung der botanischen Identität der Umekaloabo-Droge besteht in einem ethnobotanischen Quellenstudium. Hierzu bot ein vom DAAD unterstützter einjähriger Aufenthalt in Südafrika Gelegenheit.

Es wurden Informationen über Pflanzen gesammelt, die von dem Stamm der Zulus (Grahamstown bis nordöstlich von Durban, "valley of the thousand hills") gegen tuberkulöse Erkrankungen zur Anwendung kamen.

Unter dem Volk der Zulus ist die Tuberkulose, ebenso wie im übrigen Teil Afrikas sehr verbreitet. Nach Angaben von Dr. A.BRYANT⁶⁾, der mehr als vierzig Jahre unter den Zulus gelebt hat, ist die Anfälligkeit der dortigen Eingeborenen gegen Krankheiten der Atmungsorgane besonders groß. Zahlen, die wir von Dr.KLEEBERG^{*)} erhielten, bestätigten, daß in der Transkei, Zululand und Nordtransvaal die höchste Zahl an TBC-Kranken (von 200 Menschen hat eine Person offene TBC, das entspricht 0.5%) zu finden ist.

Aus Gesprächen mit Dr.KLEEBERG ging jedoch hervor, daß die TBC-Anfälligkeit für alle schwarzen Rassen zutrifft, die von veränderten Lebensverhältnissen, wie Urbanisierung und Unhygiene betroffen werden.

Tuberkulose wurde durch weiße Siedler, besonders nach dem Auffinden von Gold und Diamanten im Jahre 1867, eingeschleppt. Tausende von Bantus verließen ihre isolierten Dorfgemeinschaften und folgten den Siedlern. Bereits nach kurzer Zeit war ein großer Personenkreis infiziert. Von 1895 bis 1925 konnte ein enormes Anwachsen von Tuberkulose beobachtet werden.

Eine weitere Steigerung der TBC-Rate war im zweiten Weltkrieg zu verzeichnen. Südafrika hat auch heute noch eine sehr hohe Krankenziffer an Tuberkulosekranken. Diese werden zwar mit

*) Dr.Kleeberg, Director of the Tuberculosis Research Unit, Ondersdepoort-South Africa.

modernen Arzneimitteln behandelt, doch verlassen sie nach Abklingen der typischen Symptome der TBC sehr häufig die Hospitäler und kehren in ihre Heimatdörfer zurück, um sich dort von den ihnen mehr vertrauten einheimischen Heilkundigen("herbalists") behandeln zu lassen.

Bei den Zulus werden verschiedene Krankheiten, die die Symptome der Tuberkulose zeigen, mit dem Ausdruck "umKhulane" beschrieben. Er umfaßt alle Krankheiten, die mit Fieber, Husten, Schwächegefühl, Brustschmerz und vor allem einer starken Sekretion verbunden sind. Differenziertere Ausdrucksweisen für die Beschreibung des Hustens sind "uSi", der Reizhusten, "uDosi", der trockene Husten und "uPhepha" ein bellender Husten. Das Auftreten schneidender Schmerzen in der Brust wird meist "uHlabo" genannt.

Für die Behandlung kennt der einheimische Pflanzenkundige eine Vielzahl von Pflanzen, die auszugsweise in Tabelle 1, S.10, mit ihren einheimischen und botanischen Namen wiedergegeben wird.

Der Name Umckaloabo konnte von keinem der befragten Heilkundigen zugeordnet werden. Es ist aber denkbar, daß hierfür die starken Unterschiede in Schreibweise und Aussprache verantwortlich zu machen sind. So könnte man annehmen, daß bei der schriftlichen Niederlegung des Eingeborenen-Namens durch den Engländer STEVENS, die eigenartigen "Schnalzlaute" der Sprache nur unvollkommen erfaßt wurden. Würde man Umckaloabo als "umKhaloabo" schreiben, was etwa der gleichen Aussprache entspräche, so wäre die Beziehung zu der Sprache der Zulus, Worte wie umKhulane, dem umfassenden Begriff für die Symptome der TBC oder uHlabo, dem schneidenden Schmerz in der Brust, gegeben. Eine Kombination beider Begriffe zu "umKhuhlabo" zeigte einen ähnlichen Ausdruck wie Umckaloabo mit der gleichen Aussprache.

Sicher kann jedoch gesagt werden, daß Beziehungen zwischen dem Ausdruck Umckaloabo und der Sprache der Zulus bestehen. Das weist auf das Wachstum der Pflanze in dieser Region hin oder auf die Anwendung als Tuberkulosemittel.

Völlig auszuschließen war jedoch das Gebiet der südlichen Sotho, dem früheren Basutoland und dem heutigen Staat Lesotho, das Stevens als Wachstumsgebiet der Pflanze mit angab. Hier wird kein Zusammenhang mit der Eingeborenen-sprache offenkundig. Möglicherweise liegt hier eine bewußte Irreführung vor, um die Herkunft der Droge aus kommerziellen Gründen zu verschleiern.

T a b e l l e 1

Zulu-Name	Botanischer Name	Ordnung
uMathunga	<i>Cyrtanthus obliquus</i> Ait.	Amaryllideae
iDumbhi-lik'- ntloyile	<i>Haemanthus natalensis</i> Pappe	Amaryllideae
iQwaningi	<i>Capparis corymbifera</i> E.M.	Capparideae
uMabusana	<i>Capparis gueinzii</i> Sond.	Capparideae
inGqwangane	<i>Celastrus buxifolius</i> L.	Celastraceae
iHlinzanyoka	<i>Celastrus</i> sp.	Celastraceae
uDlutshana	<i>Aster asper</i> Less.	Compositae
iBohlololo	<i>Senecio speciosus</i> Willd.	Compositae
uHlungu-lungu	<i>Veronica corymbosa</i> Less.	Compositae
uThangazana	<i>Cucumis hirsutus</i> Sond.	Cucurbitaceae
isiZimane	<i>Euclea natalensis</i> A.D.C.	Evenaceae
uSununundu	<i>Acalypha peduncularis</i> Meisn.	Euphorbiaceae
uMahlabekufeni	<i>Croton gratissimum</i> Burch.	Euphorbiaceae
umZilanyoni	<i>Croton sylvaticum</i> Hochst.	Euphorbiaceae
iBoza	<i>Moschosma riparia</i> Hochst.	Labiatae
umKhokha	<i>Abrus precatorius</i> L.	Leguminosae
uSi	<i>Crotolaria</i> sp.	Leguminosae
inTsangwana	<i>Thephrosia kraussiana</i> Meisn.	Leguminosae
isiGobo	<i>Asparagus</i> sp.	Liliaceae
umNyamathi	<i>Ekbergia meyeri</i> Presl.	Meliaceae
iSundu	<i>Phoenix reclinata</i> Jacq.	Palmae
umPhafa	<i>Zizyphus mucronata</i> Willd.	Rhamnaceae
uMampeshana	<i>Oldenlandia decubens</i> Hiern.	Rubiaceae
umNungwane	<i>Zanthoxylum capense</i> Harv.	Rutaceae
iYoli	<i>Datura stramonium</i> L.	Solanaceae
inThlashane	<i>Lichtensteinia inter-</i> <i>rupta</i> E.M.	Umbelliferae

IV. Hinweis auf die Identität der Umcka-Droge

Aus den bisherigen Untersuchungen des Drogenpulvers geht hervor, daß eine gerbstoffhaltige Droge vorliegt, die keine Identität mit den bekannten Gerbstoffdrogen *Radix Tormentillae*, *Radix Ratanhiae* und *Radix Bistortae* zeigt.

Gerbstoffreiche Drogen liefern zahlreiche Familien der Dicotyledonae. Besonders reich an Gerbstoffen sind die Rosaceae, Leguminosae und Geraniaceae.

Wir konzentrierten uns daher bei der Suche nach der Stammpflanze auf diese drei Familien. Die Anatomie und Morphologie von Leguminosen- oder Rosaceen-Wurzeln weist keine Ähnlichkeit oder Übereinstimmung mit unserer Droge auf. Dagegen stimmt die Beschreibung einiger Geraniumdrogen in vielen Punkten mit unserer Droge überein. Bei *Rhizoma Geranii maculatii* L. wird außerdem der Gehalt an Calciumoxalat⁷⁾ erwähnt. Wie vergleichende Untersuchungen von BRANDT und SCHLUND⁸⁾ zeigen, enthalten zahlreiche Geraniumarten, wie z.B. *Geranium pratense* viel Gerbstoff. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß WASICKY in einer Übersicht in "Physiopharmakognosie"⁹⁾ die Wurzel von *Geranium robertianum* L. als Volksheilmittel bei Hämorrhagien, besonders aus Lunge und Nase, auführt.

Hier läge in der Tat eine ähnliche therapeutische Anwendung wie bei der Umckaloabo-Droge vor.

Wir untersuchten einige Geraniaceen, die uns freundlicherweise aus dem Garten des Botanischen Institutes der Universität München zur Verfügung gestellt wurden.

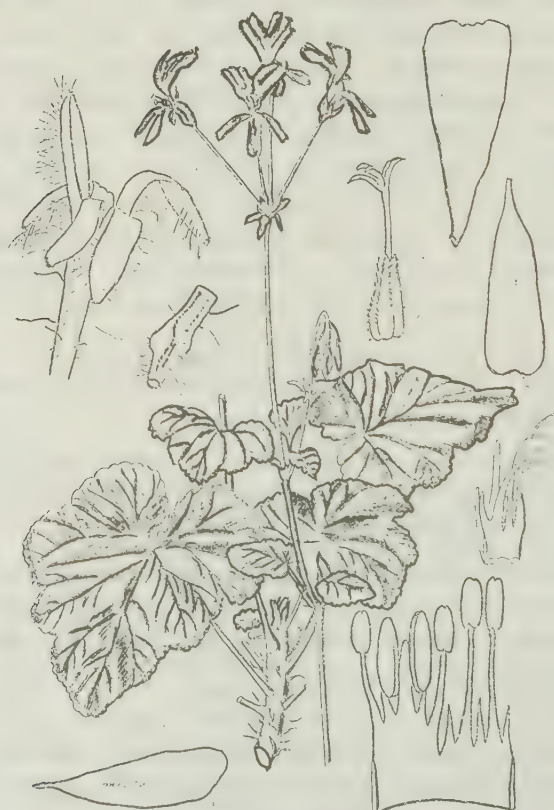
Chromatographische Untersuchungen der methanolischen Gesamtextrakte ergaben bei allen Arten stark blau fluoreszierende Zonen im langwelligen UV, jedoch keine direkte Übereinstimmung im chromatographischen Bild.

Die Hydrolysate von *Geranium robustum* L., hergestellt mit 5%iger HCl, wiesen zwei Zonen mit ähnlichen R_f -Werten wie bei der Umckaloabo-Droge auf. Bei *Pelargonium myrrifolium* Ait. und *Pelargonium cucullatum* Ait. stimmten sogar drei

Hauptzonen mit denen der Umcka-Droge überein.

Die Vermutung, daß es sich um eine *Pelargonium*art handelt, wurde auch von Experten des KEW-Gardens in England bestätigt. Nach dem vorgelegten Wurzelstück könnte es sich um eine *Pelargonium reniforme* Curt. handeln.

Dieser Hinweis gab Veranlassung, einige in Südafrika heimische *Pelargonium*arten aus ihren Einzugsgebieten chromatographisch zu untersuchen und die Identität mit *Pelargonium reniforme* Curt. auch auf diese Weise zu sichern.



Pelargonium reniforme

B. Chromatographische Untersuchungen südafrikanischer Pelargoniumarten

I. Herkunft und Beschreibung

In Südafrika gibt es mehr als 250 Pelargoniumarten, deren Verbreitung im Süden des Landes von der östlichen über die westliche Kapprovinz bis Natal reicht und sich im Norden bis Transvaal erstreckt.

Das Aussehen der Pflanzen ist ähnlich unseren heimischen Arten, meist niedrigwachsend, einzeln stehend, selten in Kissenanordnung, manchmal auch buschartig. Die Wurzeln sind unterschiedlich in der Form, die Stämme öfters dick und sukkulent mit unterirdischen Knollen. Die Blattformen und Anordnungen sind sehr vielgestaltig, die Blütenfarben variieren von rosa bis schwarzviolett, wobei die Blüten von unauffälligem bis ausgeprägtem Aussehen vorkommen können.

Das gemeinsame typische Kennzeichen ist der sogenannte "Storchenschnabel", ein Fruchtknoten, aus 3 - 5 verwachsenen Fruchtblättern, in einen langen aus verwachsenen Griffeln bestehenden Schnabel endend, der auch für Geranium- und Monsonia-Arten charakteristisch ist.

II. Bisherige Kenntnisse über Pelargoniumarten

Wie viele südafrikanische Pflanzen waren auch die Pelargoniumarten schon in früheren Zeiten europäischen Botanikern bekannt. So fanden sich bereits vor 100 Jahren farbige Tafeln in Curtius "Botanical Magacine", einige Jahre später in Sweet's "Geraniaceae" und in der "Flora Capensis" von HARVEY¹⁰⁾. Eine Zusammenstellung über die pharmakologischen Anwendungen durch südafrikanische Volksstämme findet sich bei einigen Pelargoniumarten in dem Werk von WATT und BREYER-BRANDWYK¹¹⁾. Jedoch berichteten die Autoren noch wenig über Inhaltsstoffe.

Arbeiten aus neuerer Zeit beschäftigten sich ausführlich mit den in den Wurzeln der Geraniaceae enthaltenen Tanninen^{12,13,14)}, wobei der Gehalt an Tanninen und Polyphenolen zwischen 10% und 30% angegeben wird.

Neben Untersuchungen über Steroide und Triterpene in *Pelargonium hortorum* L.H.Bailey¹⁵⁾ finden sich Angaben über Zimtsäurederivate und flavonoide Inhaltsstoffe in *Pelargonium zonale* (L.) L'Herit. ex Ait.¹⁶⁾ und anderen Geraniaceen¹⁷⁾. Das Vorliegen von Anthocyanidinen in Blättern und Stämmen wird von *Pelargonium endlicherianum* Fenzl berichtet¹⁸⁾. Durch chromatographische und spektrophotometrische Methoden konnten die Anthocyanidine in *Pelargonium hortorum* aufgeklärt werden¹⁹⁾.

Ausführlich beschäftigen sich verschiedene Autoren mit den Bestandteilen des ätherischen Öles. Sie stellten einen hohen Gehalt an Menthol und Menthon fest²⁰⁾.

Als ausgesprochene Weinsäureakkumulatoren werden von STAFFORD²¹⁾ und GYR²²⁾ *Pelargonium*arten bezeichnet. Weinsäure findet sich jedoch nur in den Blättern, nicht in Stengel- oder Wurzelteilen.

Alkaloide scheinen nicht in *Pelargonium*arten vorzukommen²³⁾, dagegen liegen Hinweise über das Vorkommen biogener Amine, den sogenannten "Pseudoalkaloiden" vor²⁴⁾.

III. Volksmedizinische Anwendungen

Dem vielfältigen Anwendungsbereich der *Pelargonium*arten in der einheimischen Medizin der südafrikanischen Volksstämme sollten auch bestimmte Inhaltsstoffe oder Stoffgruppen entsprechen.

Die Informationen über 13 *Pelargonium*arten wurden uns in Südafrika von heilkundigen Eingeborenen, Burenfamilien in ländlichen Gebieten, Indern, die einen mehr kommerziellen Vertrieb der pflanzlichen Heilmittel tätigen und Ärzten an Eingeborenenhospitälern, vermittelt (Tab.2, S. 15).

Bei 5 Pelargoniumarten fanden sich in dem umfassenden Werk über volksmedizinisch verwendete ost- und südafrikanische Pflanzen von WATT und BREYER-BRANDWIJK¹¹⁾ entsprechende Angaben.

T a b e l l e 2

Name	Anwendung	Zubereitung
P.BETULINUM (L.) L'Herit. ex Ait.	Durchfall, Ruhr, uterine Blutungen	5 fingerlange Wurzelstücke mit 2 Bechern Wasser 10 Min. kochen
P.CAPITATUM (L.) L'Herit. ex Ait.	Bauchschmerzen	Wurzelstück kauen, bis ein taubes Gefühl im Mund fest- stellbar ist
P.CUCULLATUM (L.) L'Herit. ex Ait.	Durchfall, Kolik, Nephritis, Harn- verhaltung 25), bei offenen Wunden	Wurzel pulverisieren, mit Wasser aufschlämmen, 2 Tage stehen lassen. Sud 2x täglich trinken. Als Wundverband wird der Wurzelbrei aufgestrichen
P.HIRTUM (Bastard)	Durchfall (Siphylis ?)	Wurzelsud, 3x täglich einen Becher trinken
P.LURIDUM Sweet	Kolik, Durchfall, Ruhr, Fieber 11)	Wurzelpulver mit Maisbrei vermischen
P.MOREANUM Sweet	Durchfall	Wurzelpulver mit Maisbrei vermischen
P.MYRRIFOLIUM (L.) L'Herit. ex Ait.	Erkältung, Hals- schmerz, Ruhr	Wurzelsud, Kauen eines Wurzel- stückes
P.RENIFORME Curt.	Ruhr. ²⁵⁾ , Durchfall 26), Kolik 27), Leber- beschwerden 11), Menstruationsbeschw., Brustschmerzen, Hu- sten, Auswurf, Fieber	Dekokt, oft mit Milch herge- stellt oder als alkoholischer Auszug (d.h. Methylalkohol wird mehrmals durch Weißbrot fil- triert und dann verwendet)
P.RADULA (Cav.) L'Herit. ex Ait.	Magenschmerzen	Wurzeln mit den Blättern in Wasser aufkochen (Blätter haben starkes Aroma)
P.SIDAEFOLIUM R.Knuth	Husten, Durchfall, Ruhr, Gonorrhoe, Un- terleibsbeschw. 11)	Wurzelsud
P.TRISTE (L.) L'Herit. ex Ait.	Blutungen, Ruhr, An- thelmicum 28) 29)	Wurzelsud oder direkt die Wurzel essen (recht wohl- schmeckend)
P.ZONALE (L.) L'Herit. ex Ait.	Ruhr	Wurzelpulver mit Essen ver- mischt

IV. Orientierende Voruntersuchungen

Die dunkelbraunen oder rötlichbraunen, selten helleren Wurzeln bestimmen die Färbung des methanolischen Extraktes und lassen auf das Vorliegen von Gerbstoffen schließen.

Bei Zugabe von Eisen-III-chloridlösung zu den verschiedenen Extrakten entstand in jedem Falle eine blauschwarze Mischfarbe, die auf Gallotannine sowie auf kondensierte Gerbstoffe hinwies.

Der Gerbstoffgehalt der dunkleren Wurzelstücke, bestimmt nach einer spektralphotometrischen Methode nach GSTIRNER³⁰⁾, lag zwischen 10 bis 12%, während die helleren Stücke einen Gehalt zwischen 8% und 10% zeigten. Die zweidimensionale Papierchromatographie in Butanol/Wasser gesättigt in der 1. Laufrichtung und 2%iger Essigsäure in der 2. Laufrichtung, lieferten nach dem Besprühen mit Benzidin-Reagenz³¹⁾ orange Flecken, die im Bereich der Katechine und Gallokatechine lagen.

Infolge des hohen Gehaltes an kondensierten Gerbstoffen zog sich über den ganzen R_f -Bereich eine braunrot gefärbte Zone und überdeckte größtenteils die charakterisierenden Flecken der Katechine und Gallokatechine.

Bei allen untersuchten Arten erhielten wir nach HCl-Behandlung blutrot gefärbte Hydrolysate. Dieses Verhalten ist typisch für Leucoanthocyanidine, die durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren zu den blauviolett gefärbten Anthocyanidinen dehydratisiert werden.

Die gebildeten Farbstoffe ließen sich mit Äther ausschütteln. Wir erhielten eine blauviolette Ätherphase, die eingeengt und auf Papierchromatogrammen im System 90%ige Ameisensäure/3n-HCl (1:1) aufgetragen, zwei violettblaue Zonen lieferte. Die von BATE-SMITH und LERNER³²⁾ ausgearbeiteten "Anthocyanidin-" und "Vanillin-Teste" verliefen ebenfalls positiv.

Papierchromatographisch waren gelblich fluoreszierende und matt dunkle Zonen feststellbar, die sich nach Besprühen mit alkoholischer KOH, Benedikt's Reagenz³³⁾ und basischem Blei-

acetat gelb anfärben ließen und einen Hinweis auf Flavonoide gaben.

Die Prüfung auf Alkaloide mit Mayer's oder Dragendorff-Reagenz verliefen negativ, jedoch traten positive Reaktionen mit Ninhydrin³⁴⁾ und Folin-Reagenz³⁵⁾ auf, die auf das Vorliegen von biogenen Aminen und Aminosäuren hindeuteten.

Bei allen untersuchten Arten konnte eine für Sterine charakteristische positive LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion³⁶⁾ festgestellt werden, außerdem färbte sich eine Zone des Chromatogramms mit SbCl_3 -Sprühreagenz an.

Die Petrolätherextrakte ergaben beim Einengen wachsartige Produkte, die zum Teil im UV-366 nm fluoreszierten und auf Kieselgelplatten im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:2:1) an der Laufmittelfront lagen. Eine Auftrennung der Gesamt-lipide gelang im System Benzol/Aceton/Wasser (91:30:8)³⁷⁾.

Die intensiv blau und violett fluoreszierenden Zonen reagierten mit Ammoniak meist unter Farbvertiefung.

Das Hydrolysat wurde über Kieselgelplatten im System Benzol/Aceton (7:3) getrennt und die Hauptfluoreszenzzone eluiert.

Das Eluat dieser Zone zeigte im UV-Spektrum ein Hauptmaximum bei 320 nm und zwei weitere Maxima bei 275 und 220 nm. Dieses Verhalten deutete auf Cumarine oder Gemische von Cumarinen mit Phenolcarbonsäure hin.

Zur weiteren Kennzeichnung von Cumarinen wird oftmals auch deren Sublimierbarkeit herangezogen. Eine Mikrosublimation direkt aus dem Drogenpulver durchgeführt, ergab ein gelbweißes Sublimat, das mit der eluierten Zone chromatographische Übereinstimmung zeigte.

Ergebnis

Nach dem Ergebnis der Voruntersuchungen enthielten alle untersuchten Pelargoniumarten einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Gerbstoff mit wechselnden Mengen Leucoanthocyanidinen, Lipiden, Sterinen, biogenen Aminen und Aminosäuren, Flavonoiden, Cumarinderivaten und Phenolcarbonsäuren.

Die Chromatogramm-Bilder der zweidimensionalen Papierchromatographie (Butanol/H₂O gesättigt (1) und 2%iger Essigsäure (2)) ergaben bei den verschiedenen Arten eine deutliche Übereinstimmung in einigen, im langwelligen UV blau bzw. violett fluoreszierenden Zonen (s.S. 19, Abb. 4).

Wie die hydrolytische Spaltung weiter zeigte (Abb. 5, S.20), lieferten die vorliegenden Cumarinderivate bei allen Arten übereinstimmend zwei blau bzw. violett fluoreszierende Verbindungen. Zusätzlich ließen sich bei drei Arten intensiv gelb fluoreszierende Zonen nachweisen.

Trotz gewisser Unterschiede in Konzentration und Zusammensetzung der Inhaltsstoffe in Abhängigkeit von Standort, Erntezeit und Aufbereitungsmethoden, ist das Vorliegen von Cumarinen ein charakteristisches Merkmal aller untersuchten Pelargonium-Arten.

Zur systematischen Bearbeitung der Inhaltsstoffgruppen wählten wir Pelargonium reniforme Curt. aus, da diese die größte Variationsbreite in den Inhaltsstoffen und die vielseitigsten Anwendungen in der südafrikanischen Volksmedizin besitzt. Chromatographische Vergleiche mit der Umckaloabo-Droge hatten außerdem ergeben, daß sie in den wesentlichen Inhaltsstoffen übereinstimmt. Der Hauptunterschied lag nur in dem extrem hohen Gehalt an Calciumoxalat bzw. Kieselsäure bei der Umckaloabo-Droge. Möglicherweise ist dieser Unterschied auf den kommerziellen Anbau der "Umcka-Pflanze" oder eine eventuelle Bastardisierung der ursprünglich vorliegenden Pelargonium-Art zurückzuführen.



Abb. 4

Papierchromatographische Untersuchung der Pelargonium-Arten

 A
  B
  C
 = intensiv blau (UV-366 nm)

 = schwach blau

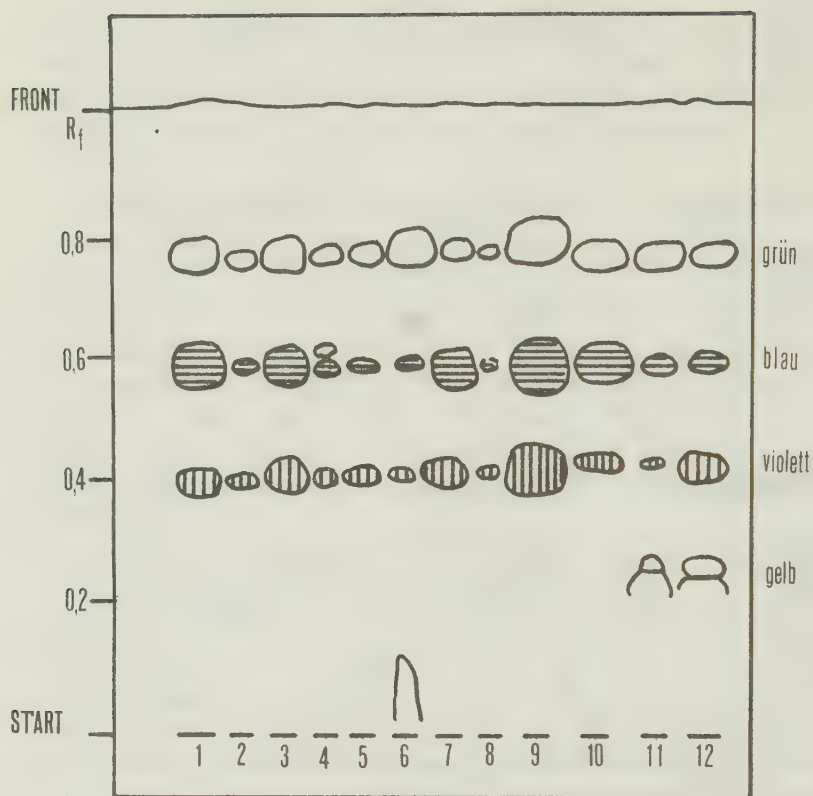


Abb. 5

Dünnschichtchromatographie der Hydrolysate (die Ziffern 1 - 12 entsprechen der alphabetischen Anordnung der Pelargoniumarten Abb. 4, S. 19) auf Kieselgel (Benzol/Aceton 7:3), Detektion nach Bedampfen mit Ammoniak und anschließendem Betrachten im UV-366 nm

C. Untersuchung über die Inhaltsstoffe von PELARGONIUM RENIFORME

Curt.-Wurzeln

I. Vorproben

Eine chromatographische Auftrennung des methanolischen Extraktes gelingt am besten in sauren Laufmittelsystemen, wie dem Padridge-Gemisch³⁸⁾.

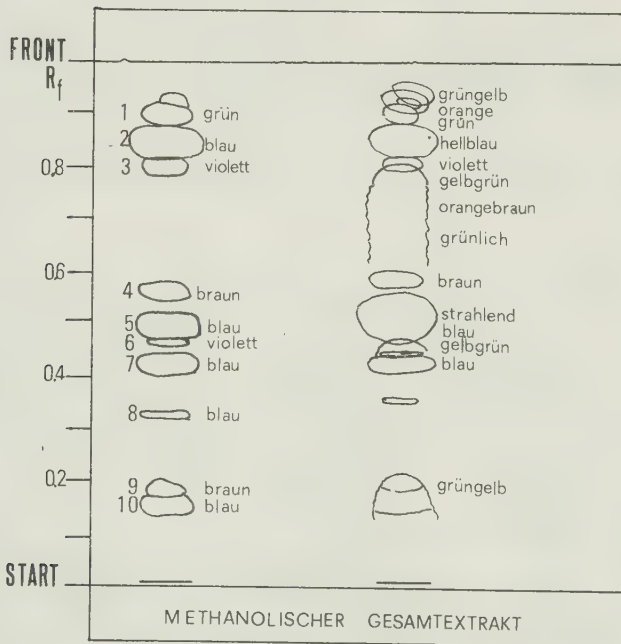


Abb. 6

Laufmittel: Padridge-Gemisch

Adsorbens : DC-Kieselgel F 254 Merck

Detektion : 1) UV-366 nm

2) + Naturstoffreagenz nach NEU³⁹⁾
modifiz. nach DIESEL 152) mit anschließendem Betrachten im UV-366 nm

Durch Scheidetrichter-Verteilung des vom Methanol befreiten Extraktes zwischen Äthylacetat und Wasser konnte der stark konzentrierte Extrakt von Gerbstoffen abgetrennt werden. Durch wiederholtes Ausschütteln reichern sich in den Oberphasen mehr und mehr die im UV-Licht fluoreszierenden Inhaltsstoffe an, während die die Auftrennung störenden Gerbstoffe in der Unterphase verblieben. Phlobaphene und andere Begleitstoffe fielen aus.

Wie die Abb. 6, S. 21, und die Tabelle 3 zeigen, sind unter den angegebenen Bedingungen mindestens 10 Flecke nachweisbar, wobei die Flecke 1, 2, 4, 5 und 6 überwiegen.

Die positiven Reaktionen, die nach Besprühen mit verschiedenen Reagenzien beobachtet werden konnten, ließen auf das Vorliegen verschiedener Substanzgruppen schließen. Daß es sich zum größeren Teil um phenolische Verbindungen handeln mußte, war aus den charakteristischen Farbänderungen ersichtlich.

T a b e l l e 3

R _f -Werte	UV-Fluoresz.	Ammoniak	Diazo-Benzidin-FeCl ₃ Reagenz		
0.92 (1)	grünlich	grünlich	-	-	graugrün
0.86 (2)	fahlblau	strahlend blau !!	gelbrot	-	-
0.80 (3)	violett	violett !	gelbrot	-	-
0.57 (4)	braun	gelbbraun	-	-	-
0.50 (5)	blau	grünblau !	rot	-	-
0.48 (6)	violett	violett !	-	-	-
0.46 (7)	blau	blau	-	-	braun
0.34 (8)	blau	blaugrün	-	orange	braun
0.20 (9)	braun	braungelb	-	orange	-
0.19 (10)	blau	blau !	gelb	orange	grünblau

Wie die zweidimensionale Papierchromatographie (Abb. 4, S. 19) zeigte, erhöht sich die Zahl der nachweisbaren Zonen bis auf 15. Dies deutete auf das Vorliegen strukturell verwandter oder isomerer Stoffe hin.

Zur UV-Messung kamen Verbindungen, die aus den Fluoreszenz-
zonen der Platte eluiert worden waren (Abb. 7). Neben den
Normalspektren wurden auch die Na-acetatverschiebungen zur
näheren Charakterisierung mit herangezogen.

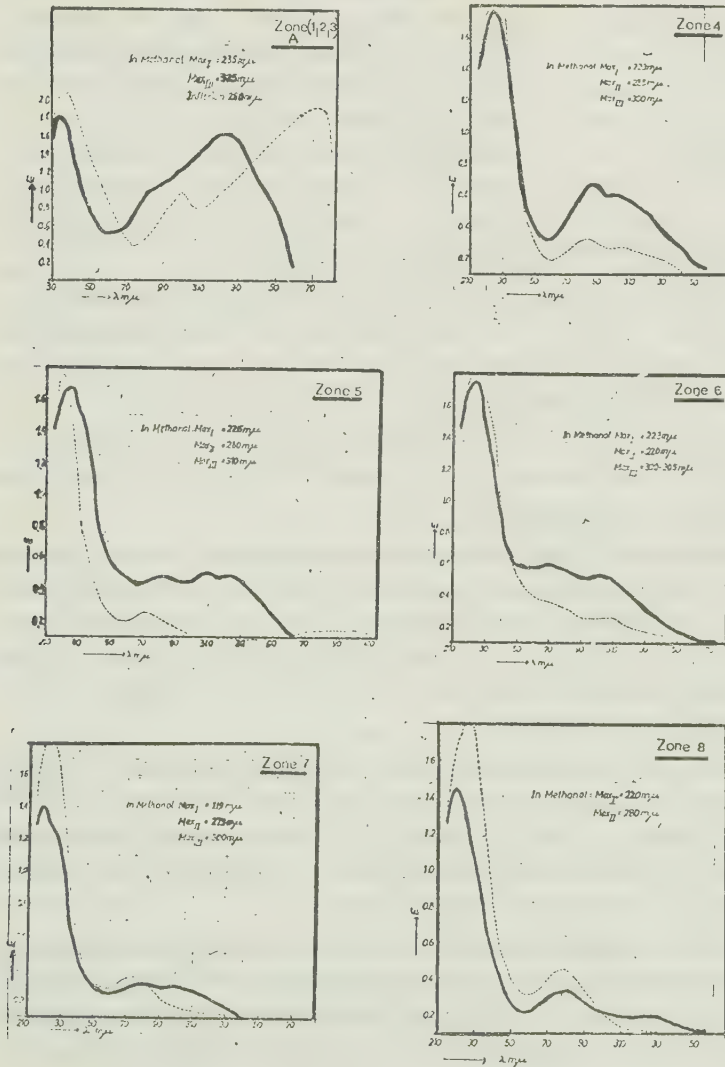


Abb. 7

Zur Interpretation der UV-Spektren sind eine Reihe von Literaturen heranzuziehen. Nach Arbeiten von BÖHME und SEVERIN⁴⁰⁾, GOODWIN und POLLOCK⁴¹⁾, MATTOO⁴²⁾, CIGNOLANI⁴³⁾, GANGULY und BAGCHI⁴⁴⁾ besitzen alle Cumarinderivate in alkoholischer Lösung mit ziemlicher Übereinstimmung drei, selten zwei Bandenmaxima und zwar bevorzugt um 220 nm, 275 ± 4 nm und 320 nm. Während die beiden ersten Maxima eine ziemliche Lagekonstanz aufweisen, kann das dritte Maximum in den längerwelligen Bereich bis 350 nm verschoben, liegen. Die Intensität der einzelnen Maxima ist allerdings je nach Substitution sehr unterschiedlich. SEN und BAGCHI⁴⁵⁾ fanden außerdem, daß bei Einführung einer Hydroxylgruppe in den Kern eine bathochrome Verschiebung der Hauptbanden bewirkt wird.

Bei zuckerfreien Cumarinen überwiegen in den Intensitäten die Maxima I und III. Bei starkem dritten Bandenmaximum kann oftmals die zweite Bande nur sehr schwach in Erscheinung treten oder ganz verschwinden.

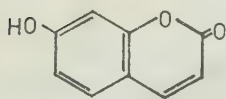
Da Furanocumarine durch ein stark ausgeprägtes Maximum bei 240 bis 250 nm charakterisiert sind⁴⁶⁾, kommen sie in unserem Falle nicht in Betracht.

Zur Diskussion stehen noch die den Cumarinen verwandten Zimtsäurederivate vom Typ der p-Cumarsäure und Kaffeesäure, die in den Spektren sehr ähnlich sind⁴⁷⁾. In diesen fehlt in den meisten Fällen das zweite Maximum bei 270 bis 280 nm. Dieses kann auch längerwellig liegen oder völlig im Maximum bei 320 bis 325 nm verschwinden.

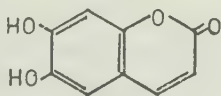
Schließlich sind noch die Spektren der Chromone in Betracht zu ziehen, worüber ausführliche Arbeiten existieren^{48,49,50,51,52)}. Demnach sind die meisten Chromone durch ein Maximum bei 290 bzw. 300 nm charakterisiert, Cumarine zeigen dagegen bei dieser Wellenlänge ein Minimum.

Nach dem Kurvenbild, Bandenfolge und relativer Bandenintensität handelt es sich bei den untersuchten Verbindungen mit größter Wahrscheinlichkeit um Cumarine bzw. Cumarinabkömmlingen. Zimtsäurederivate sind nicht ganz auszuschließen.

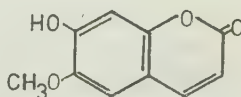
Die Veränderung des Spektrums der Zone A (Substanzgemisch 1, 2, 3) auf Na-acetatzusatz liegt größtenteils in der Bathochromieverschiebung des Umbelliferons, Aesculetins und Scopoletins.



Umbelliferon



Aesculetin



Scopoletin

Nach BÖHME und SEVERIN⁵³⁾ sind Hydroxycumarine und die entsprechenden Methyläther oder Glykoside in ihrem spektralen Verhalten sehr ähnlich (siehe auch Aesculetin/Scopoletin, Tab. 6, S. 36).

Die relativ geringe Verschiebung, die bei Spektren der Zonen 4 und 6 auf Natriumacetatzusatz erfolgte, läßt vermuten, daß hier ebenfalls Glykoside oder eventuell Ester vorliegen.

Diese Annahme wurde durch eine saure Hydrolyse des gerbstofffreien methanolischen Extraktes bestätigt. Die Summe der verschiedenen fluoreszierenden Zonen (s. Abb. 8, S. 26) lieferte fast ausschließlich das Substanzgemisch 2 und 3.

Wie aus der DC-Skizze ersichtlich, entstanden aus Zone 4 mit 5 und den Zonen im unteren R_f -Bereich (8 mit 10) nur Substanz 2. Dagegen lieferten die Zonen 6 und 7 neben Substanz 2 die violett fluoreszierende Substanz 3 und einen vorher nicht feststellbaren Fleck a, der sich mit Eisen-III-chlorid anfärben ließ.

Zone 1 scheint aus keinem Bestandteil der unteren R_f -Bereiche zu stammen.

Die Hydrolyse des methanolischen Gesamtexttraktes zeigte, daß Substanz 2 aus den meisten Verbindungen stammt. Sie wurde deshalb zuerst isoliert.

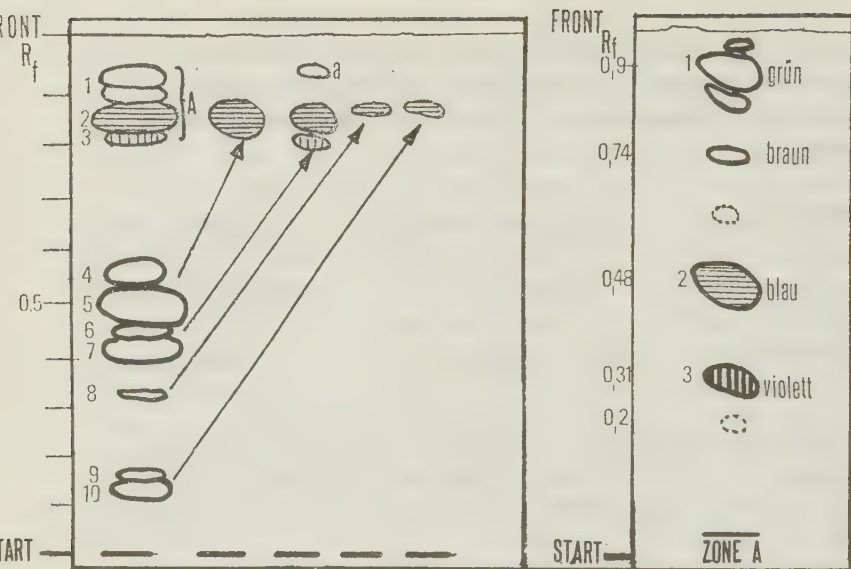


Abb. 8

Dünnschichtchromatographie der
Hydrolysate der Einzelzonen des
meth.Gesamtextraktes in BEW 4:2:1

Dünnschichtchromatographie
der Zone A auf Kieselgel in
Benzol/Aceton 7:3

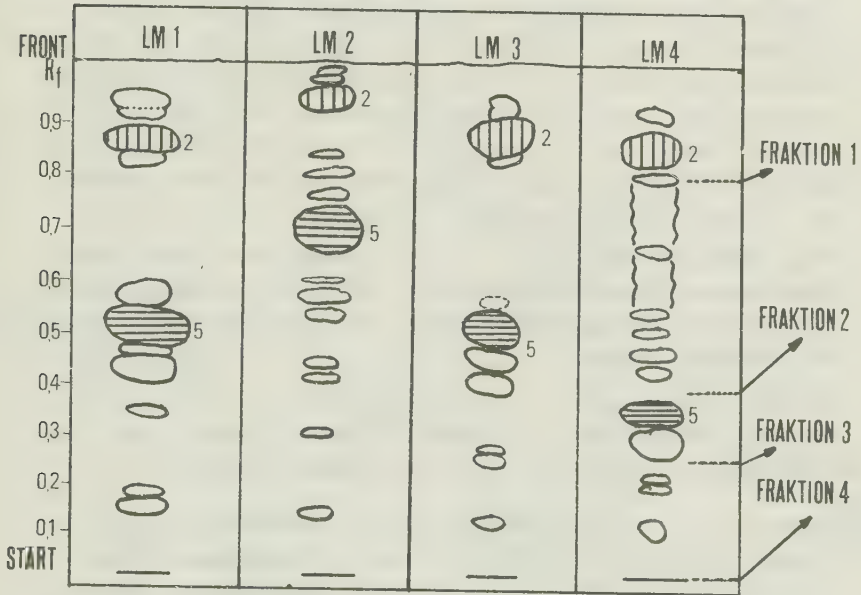
Detektion im UV-366 nm

II. Isolierungen

Der mit Petroläther entfetteten Droge wurden durch nachfolgende Acetonextraktion vorzugsweise Cumarinaglykone entzogen. Da durch Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln der eluotropen Reihe keine Trennungen erzielt werden konnten, wurde von einem durch kontinuierliche Soxhlet-Extraktion hergestellten Methanol-Extrakt ausgegangen.

Aus dem stark gerbstoffhaltigen Extrakt entfernten wir die Tannine durch Chromatographie an einer kurzen breiten Kieselgelsäule im System Chloroform/Methanol (8:2). Damit konnte gleichzeitig eine Grobtrennung in Verbindungen von mehr lipo-

philen und mehr hydrophilen Eigenschaften erreicht werden. Die Substanzzusammensetzung der vier Fraktionen ist aus dem nachfolgenden DC-Schema ersichtlich.



Schema 1

DC des methanolischen Gesamtextraktes

LM 1 = Butanol/Eisessig/Wasser (4:2:1)

LM 2 = Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser (10:2:3)

LM 3 = Äthylacetat/Methanol/Wasser (100:17:13)

LM 4 = Chloroform/Methanol (8:2)

Von den 4 Fraktionen arbeiteten wir zunächst Fraktion 1 auf.

1. Isolierung von Substanz 2

Versuche, Substanz 2 dem Extrakt durch organische Lösungsmittel selektiv zu entziehen, blieben erfolglos.

Da die Substanz 2 im Acetonauszug und in Fraktion 1 in relativ geringer Konzentration vorhanden war, hydrolysierten wir den methanolischen Extrakt und schüttelten das Aglykongemisch mit Äther/Äthylacetat (1:1) aus. Nach dem Einengen entstand ein violetter Rückstand, dessen Farbe auf die gebildeten Anthocyanidine zurückzuführen war. Trennversuche mit verschiedenen Adsorbentien und Elutionsmitteln zeigten die günstigste Anreicherung an Kieselgel mit Toluol/Äthylacetat (5:4).

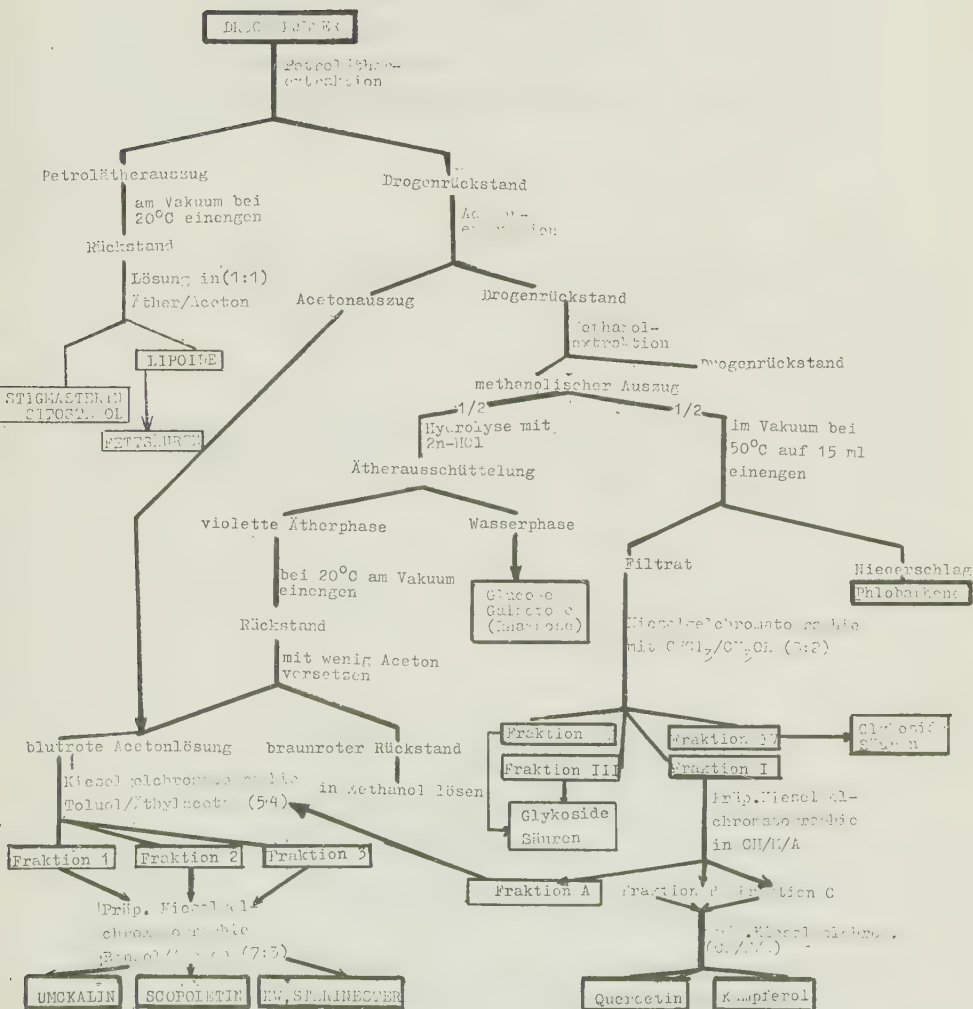
Die Wanderung der blau fluoreszierenden Zonen wurde unter dem langwelligen UV beobachtet. Substanz 2 lief vor Substanz 3 auf der Säule und konnte in gelbgefärbten Eluaten aufgefangen werden.

Die chromatographisch reinen Fraktionen der Substanz wurden nochmals über Kieselgel im System Benzol/Aceton (7:3) zur Gewinnung einer kristallinen Verbindung gereinigt.

Substanz 2 kristallisiert in feinen gelbweißen Nadeln vom Schmelzpunkt $146 - 147^{\circ}\text{C}$ aus Äthylacetat/Äthanol (1:10). Sie zeigt gute Löslichkeit in Äther, Äthylacetat, Aceton, Chloroform und Äthanol, war jedoch praktisch unlöslich in Wasser.

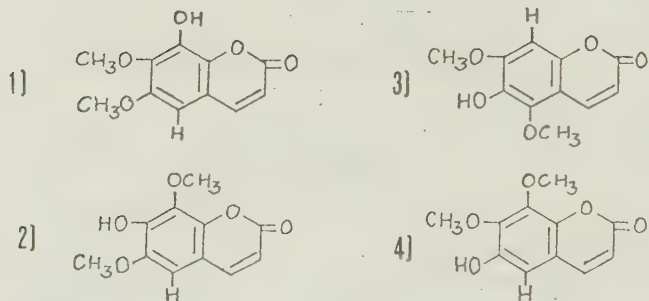
Die Verbindung lieferte ein Monoacetat vom Schmelzpunkt 121°C und ergab bei der Bestimmung nach Mikro-Zeisel zwei Methoxygruppen.

Isolierungsschema



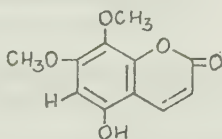
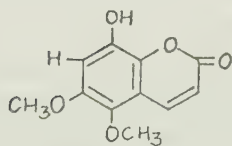
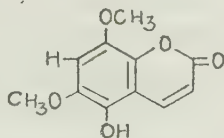
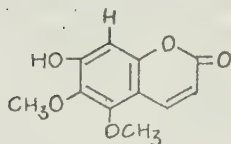
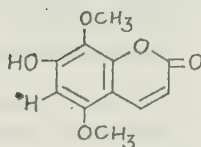
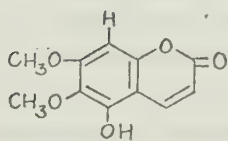
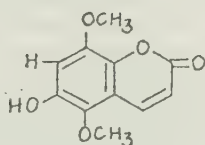
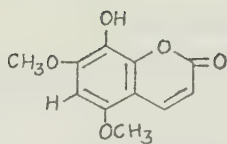
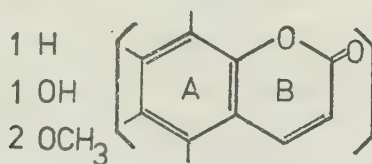
2. Strukturaufklärung von Substanz 2

Die isolierte Substanz lieferte im Massenspektrum einen Molekülpeak bei 222, der zugleich der Base peak war. Vier bekannte Cumarine mit einer Hydroxy- und zwei Methoxygruppen im A-Ring besitzen das gleiche Molekulargewicht. Sie unterscheiden sich nur in der relativen Stellung der OH-Gruppe zu den beiden benachbarten Methoxygruppen:



- 1) 8-Monohydroxy-7,6-dimethoxy-cumarin⁵⁴⁾
(Fraxidin) Fp. 196 - 197°C
- 2) 7-Monohydroxy-6,8-dimethoxy-cumarin⁵⁴⁾
(Isofraxidin, Calycanthogenol) Fp. 148 - 149°C
- 3) 6-Monohydroxy-5,7-dimethoxy-cumarin⁵⁵⁾
(Fraxinol) Fp. 171 - 173°C
- 4) 6-Monohydroxy-7,8-dimethoxy-cumarin⁵⁶⁾
(Syntheseprodukt) Fp. 186°C

Für ein Monohydroxy-dimethoxy-cumarin, das nur im A-Ring substituiert ist, sind außerdem folgende 8 andere Strukturen möglich:



- a) Aus dem chromatographischen Verhalten lassen sich einige Gesetzmäßigkeiten in Bezug auf das Substitutionsmuster der Cumarine ableiten (siehe Tabelle 4).

T a b e l l e 4

DC/Kieselgel (Chloroform/Methanol 97.5:2.5) Detektion UV-366 nm

R _f -Werte	Cumarine	
	<u>zwei Hydroxylgruppen:</u>	
0.11	5,7-Hydroxycumarin	(1)
0.16	6,7-Hydroxycumarin (Aesculetin)	(2)
0.26	7,8-Hydroxycumarin (Daphnetin)	(3)
	<u>eine Hydroxylgruppe:</u>	
0.49	7-Hydroxycumarin (Umbelliferon)	(4)
	<u>eine Hydroxy- und eine Methoxygruppe:</u>	
0.58	7-Hydroxy-6-methoxycumarin (Scopoletin)	(5)
	<u>eine Hydroxy- und zwei Methoxygruppen:</u>	
0.61	7-Hydroxy-6,8-methoxycumarin (Isofraxidin)	(6)
0.63	X-Hydroxy-X,X-methoxycumarin (Substanz 2)	(7)
0.69	6-Hydroxy-5,7-methoxycumarin (Fraxinol)	(8)
	<u>eine Methoxygruppe:</u>	
0.87	7-Methoxycumarin (Herniarin)	(9)
	<u>zwei Methoxygruppen:</u>	
0.88	5,7-Methoxycumarin (Limettin)	(10)
	<u>drei Methoxygruppen:</u>	
0.80	5,6,7-Methoxycumarin	(11)

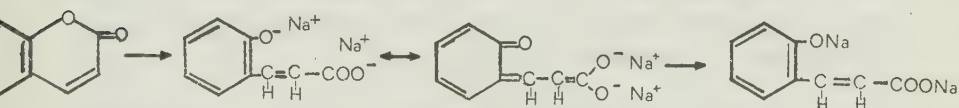
Bekanntlich weisen Cumarine mit phenolischen Hydroxylgruppen in mittel lipophilen Laufmittelsystemen einen niedrigeren R_f-Wert auf, als solche, die eine Methoxygruppe enthalten. Dihydroxycumarine (1, 2, 3) liegen im R_f-Wert niedriger als beispielsweise das monosubstituierte Umbelliferon (4). Ersatz einer Hydroxylgruppe durch ein Methoxyl läßt den R_f-Wert von (2)

nach (5) von 0.16 auf 0.58 ansteigen. Die Einführung weiterer Methoxygruppen im A-Ring (6, 7, 8) ändert den R_f -Wert im Vergleich zu (5) nur noch geringfügig.

Fehlt dagegen die Hydroxylgruppe im Molekül völlig beobachtet man einen R_f -Sprung nach 0.88 (9, 10, 11). Die Zahl der Methoxyle scheint in diesem Laufmittelsystem nur eine unwesentliche Rolle zu spielen.

Die Isomeren von Substanz 2 liegen in ähnlichen R_f -Bereichen. Substanz 2 zeigt eher ein Verhalten wie Isofraxidin oder Scopoletin, die beide eine freie 7-OH-Gruppe besitzen.

- b) Das Fluoreszenzverhalten von Substanz 2 ist ebenfalls ähnlich dem von Isofraxidin und Scopoletin. Im langwelligen UV treten charakteristische Fluoreszenzänderungen auf einer Kieselgelplatte auf, wenn anschließend mit Alkali besprüht wurde (Tab.5, S.34). Diese Fluoreszenzänderungen werden der Pyronringöffnung und Stabilisierung des Carboxy-Phenolat-Ions bzw. Salzbildung zugeschrieben.



Isofraxidin, Scopoletin und Substanz 2 besitzen eine stärkere Fluoreszenz als Aesculetin. Nach STEINEGGER u. HÄNSEL⁵⁸⁾ ist bei Aesculetinderivaten bei einer freien 7-OH-Gruppe und einer 6-Methoxygruppe oder einem 6-O-Glykosidrest stärkere Fluoreszenz als beim unsubstituierten Aesculetin zu beobachten.

T a b e l l e 5

Cumarin	366 nm	366 nm+0,1n-NaOH
7-OH (Umbelliferon)	blauviolett	blau !
7-OH-6-OCH ₃ (Scopoletin)	violettblau	blau !
<u>Substanz 2</u>	hellblau	blau-(grün) !
7-OH-6,8-OCH ₃ (Isofraxidin)	hellblau	blaugrün
6,7-OH (Aesculetin)	fahlblau	braungelb
7,8-OH (Daphnetin)	grünbraun	grünbraun !
5,7-OCH ₃ -7-OH (Fraxinol)	gelbbraun	oker
5,7-OH	fahlblau	oker

Das 5,7-Dihydroxycumarin verhält sich wie Aesculetin, das 7,8-Dihydroxycumarin (Daphnetin) gibt dagegen eine gedeckte grünbraune Fluoreszenz, ähnlich dem 5,7-Dimethoxy-6-hydroxycumarin (Fraxinol).

Umbelliferon, Scopoletin, Isofraxidin und Substanz 2 zeigen nach Behandlung mit Alkali übereinstimmend eine Verstärkung der blauen Fluoreszenzen, während die anderen Cumarine mehr bräunliche Fluoreszenzen aufweisen.

Das Fluoreszenzverhalten im Tageslicht ist bei Monohydroxycumarinen je nach pH-Wert verschieden.

Bei 5- und 8-Hydroxycumarinen ist weder in neutraler, saurer noch in alkalischer alkoholischer Lösung eine Fluoreszenz zu beobachten. Ein 6-Hydroxy-Cumarin zeigt im Säuren, das 7-Hydroxycumarin sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu eine blaue Fluoreszenz.

Bei Substanz 2 tritt im Alkalischen die für 7-Hydroxycumarine typische Tageslicht-Fluoreszenz auf. Im Säuren ist anstelle der beschriebenen blauen⁵⁷⁾ eine gelbgrüne Fluoreszenz festzustellen. Scopoletin und Isofraxidin verhalten sich entsprechend.

Eindeutige Aussagen lassen sich aus dem Chromatographie- und Fluoreszenzverhalten nicht machen, doch geben sie Hinweise auf eine vorhandene freie Hydroxylgruppe in 7-Stellung.

- c) Das UV-Spektrum von Substanz 2 charakterisieren zwei Maxima bei 220 und 330 nm und eine Inflexion bei 255 nm. Auf Na-acetatzusatz verschiebt sich die längerwellige Bande um $\Delta = +50$ nm (Abb. 9).

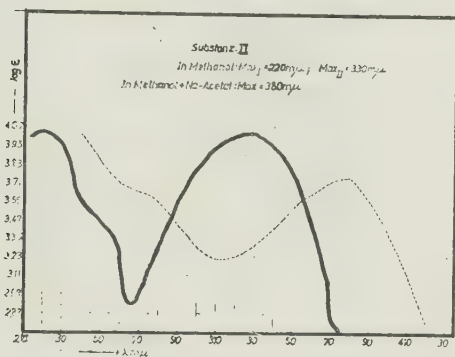


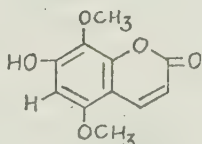
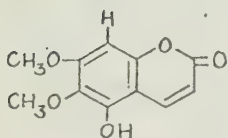
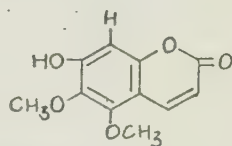
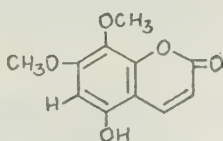
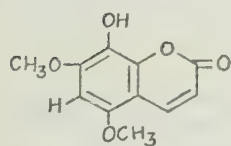
Abb. 9

Von den zu Vergleichszwecken aufgenommenen UV-Spektren einiger authentischer Cumarinderivate (Tab. 6, S. 36) zeigen Umbelliferon, Scopoletin, Aesculetin und Isofraxidin größenordnungsmäßig auf Na-acetatzusatz ungefähr gleiche bathochrome Verschiebung ihres langwelligen Maximums. Da sie alle über eine C-7-Hydroxylgruppe verfügen, läßt sich die beobachtete Verschiebung (bathochrom und hyperchrom) ohne weiteres durch Dissoziation und Salzbildung am phenolischen Hydroxyl erklären.

T a b e l l e 6

Cumarine	-Methanol-			-Methanol+Na-acetat-			
	Maxima	bzw.	Max _{III}	Verschiebung			
	(Inflexionen)						
(1) <u>Umbelliferon</u> <u>7-OH</u>	222	(245) 254	-	325	372	+47	
(2) <u>Aesculetin</u> <u>6,7-OH</u>	228	256 (261)	298	347	393	+46	Hyperchrom
(3) <u>Scopoletin</u> <u>6-OCH₃-7-OH</u>	228	253 (260)	296	345	391	+46	Hypochrom
(4) <u>Isofraxidin</u> <u>6,8-OCH₃-7OH</u>	227	(257)	(304)	342	397	+55	
(5) <u>Fraxetin</u> <u>6-OCH₃-7,8-OH</u>	-	(258)	-	337	395 (412)	+59	
(6) <u>Fraxinol</u> <u>5,7-OCH₃-6-OH</u>	232	(255)	310	339	318 410	+8 +71	
(7) <u>Daphnetin</u> <u>7,8-OH</u>	-	262	-	325	342 382	+17 +57	
(8) <u>5,7-OH</u>	(224)	(251) 257	-	329	(340) 380	+11 +51	
(9) <u>5,7-OCH₃</u>	-	245 255	-	326	-	-	

Dieses Ergebnis läßt ebenso wie das Chromatographie- und Fluoreszenzverhalten von den angegebenen 8 Strukturmöglichkeiten (s.S.31) nur noch folgende 5 Strukturen zu:



- d) Das Infrarot-Spektrum bestätigt das Cumaringerüst, bringt aber keinen weiteren Aufschluß: C=O-Bande bei 1720 cm^{-1} charakteristisch für α -Pyrone, Absorptionsbanden bei 1625 und 1640 cm^{-1} , die eine klare Unterscheidung zum isomeren Benzo- γ -Pyrone ermöglichen, die OH-Bande bei 3350 cm^{-1} und eine Bande bei 1035 cm^{-1} die nach EISSENBEISS und SCHMID⁵⁹⁾ typisch für Cumarine mit Methoxygruppen ist. Eine auffallend starke Bande bei 825 cm^{-1} dürfte den γ -Schwingungen des A-Ringes zuzuordnen sein.

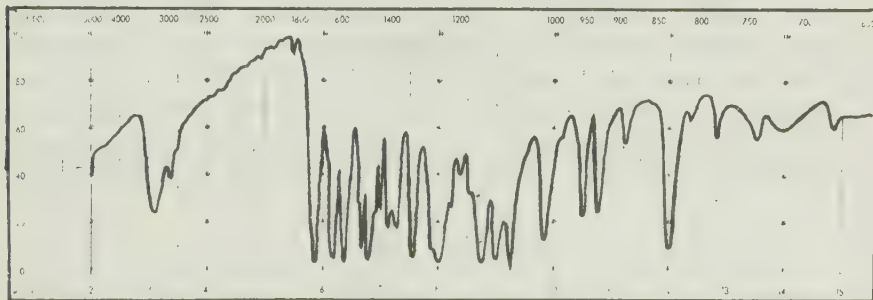
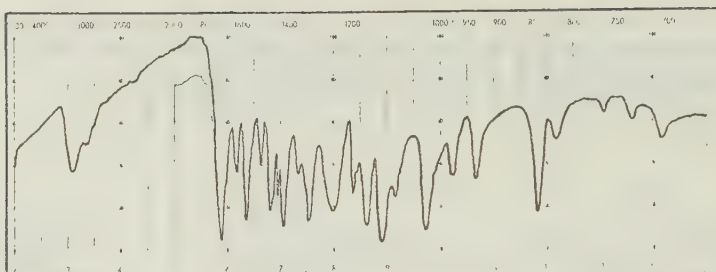
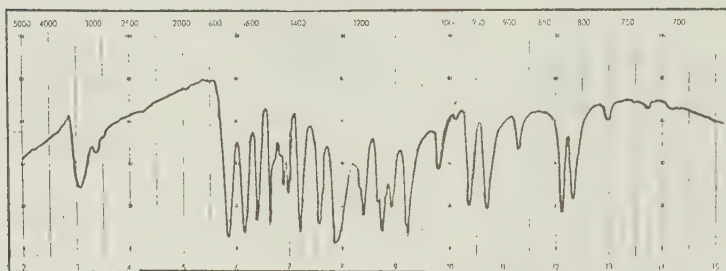


Abb. 10

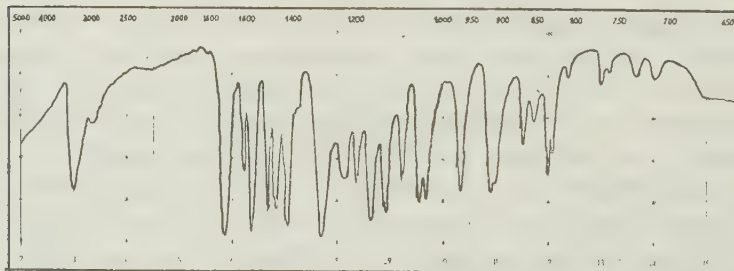
IR-Spektrum von Substanz 2



FRAXIDIN



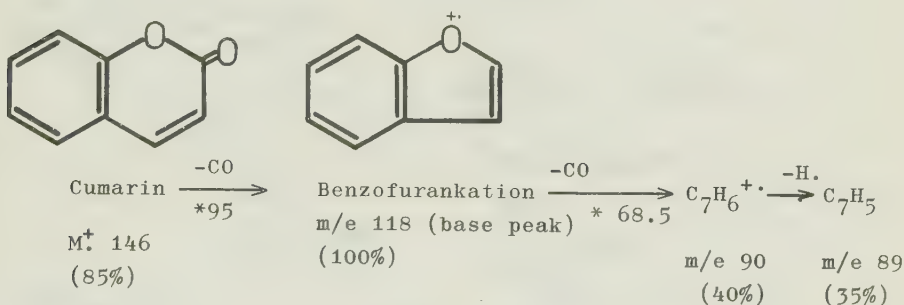
FRAXINOL



ISOFRAXIDIN

IR-Vergleichsspektren von Fraxidin, Fraxinol und Isofraxidin

- e) Das Massenspektrum der Substanz 2 ergibt die typische Fragmentierung von Cumarinen (Abb. 12, S.45 und Schema 4, S. 44). Zwei Merkmale charakterisieren den Zerfall der α -Pyrone. Die Fragmentierung geht unter mehrmaliger Abspaltung von stabilem neutralem CO vor sich, wobei der Lactonring wie im Falle des unsubstituierten Cumarins über ein Benzofurankation in einen C-7-Körper übergeht.

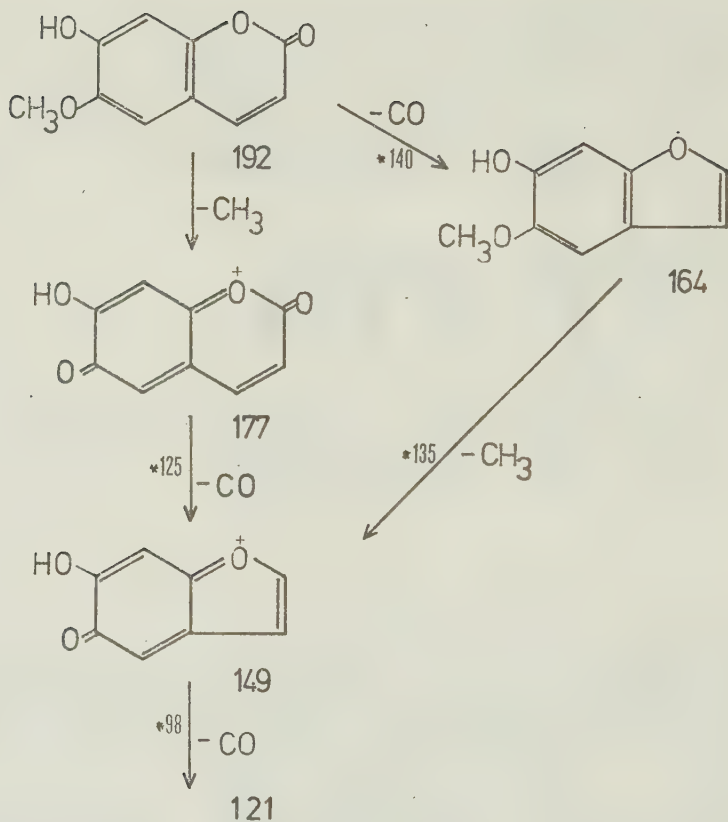


Das zweite Charakteristikum ist die hohe Intensität des Molekülpeaks.

Die Einführung einer Hydroxylgruppe am Cumarinringsystem bedingt eine mehrmalige C=O-Abspaltung, wobei jedoch die Hydroxylgruppe wie bei einfachen Phenolen⁶⁰⁾ erst sehr spät abgespalten wird.

Bei Methylierung der Hydroxylgruppe zeigt sich wiederum eine C=O-Abspaltung, die jedoch mit dem Verlust einer Methylgruppe alterniert.

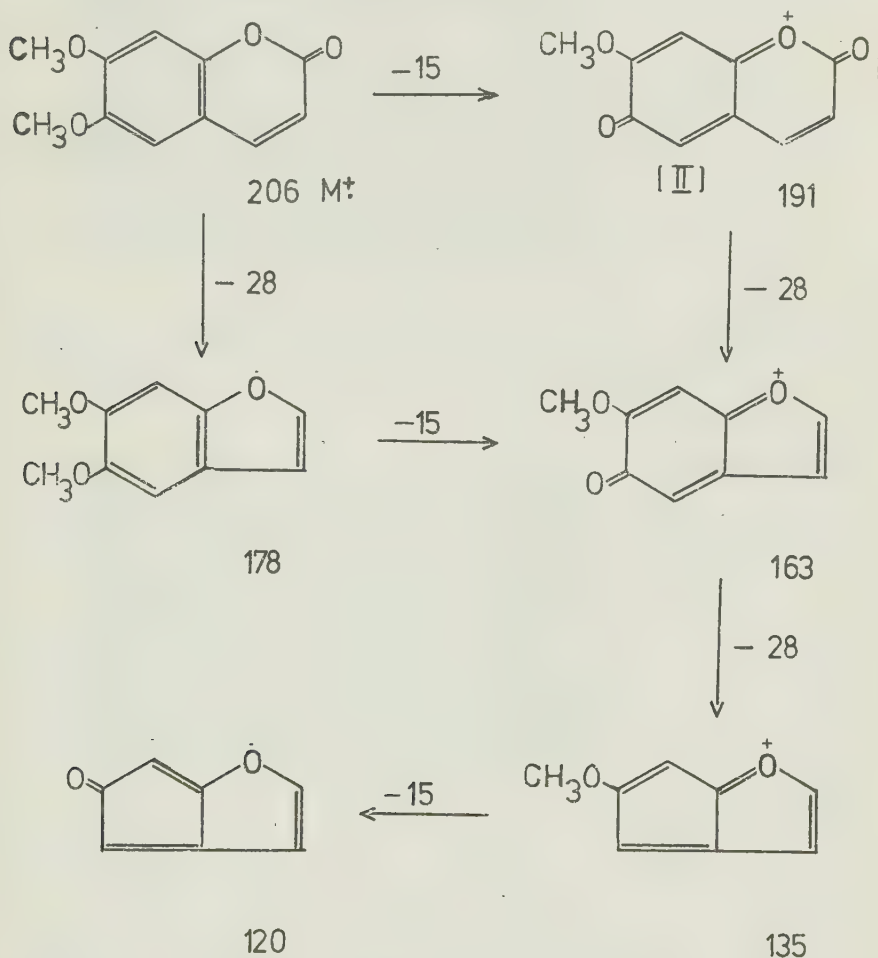
Wie weiter am Beispiel eines disubstituierten Produktes, dem 6-Methoxy-7-hydroxy-cumarin (Scopoletin) gezeigt werden kann, sind zwei Zerfallswege möglich, wobei die Abspaltung der Methylgruppe immer dann bevorzugt ist, wenn dadurch die Bildung parachinoider Strukturen möglich ist (Schema 2, S. 40).



Schema 2

Fragmentierung von Scopoletin

Für die Strukturaufklärung von Substanz 2 geben die Spektren von 6,7-Dimethoxy- und 5,7-Dimethoxy-Cumarin gute Hinweise. Die Ausbildung chinoider Strukturen bestimmt hier die typische Fragmentierung (siehe Schema 3).



Schema 3

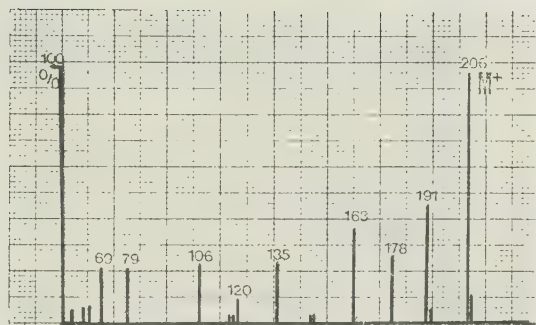
Fragmentierung des 6,7-Dimethoxycumarins

V.d.MERWE⁶¹⁾ konnte durch Deuterierung der 7-Methoxygruppe von 6,7-Dimethoxy-Cumarin beweisen, daß die erste M-15-Ele-minierung vom C-6-Methoxyl stammen muß und nicht vom C-7-Methoxyl, da der Fragmentierungspeak jetzt bei 194 (M-15) und nicht bei 191 (M-18) liegt.

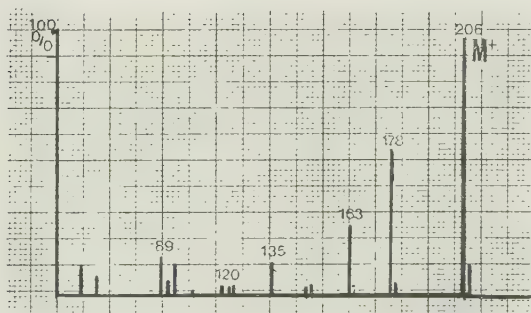
Dies erklärt die unterschiedliche Anfangsfragmentierung der beiden Methoxy-Cumarine (Abb. 11, S. 43).

Beim 5,7-Dimethoxy-Cumarin ist die Ausbildung der parachinoi-
den Struktur II (s.Schema 3, S. 41), die beim 6,7-Dimethoxy-
Cumarin bevorzugt ist, nicht möglich. Es fehlt somit der
m/e 191 Peak (M-CH₃). Dafür zeigt der m/e 178 Peak (M-CO)
eine hohe relative Intensität (Abb. 11, S. 43).

Substanz 2 liegt als trisubstituiertes Cumarin vor, dessen
Massenspektrum in der ersten Eleminierung deutlich die be-
vorzugte Abgabe von M-CH₃ vor M-C=O zeigt (siehe Schema 4,
S. 44 und Tabelle 7, S. 47).

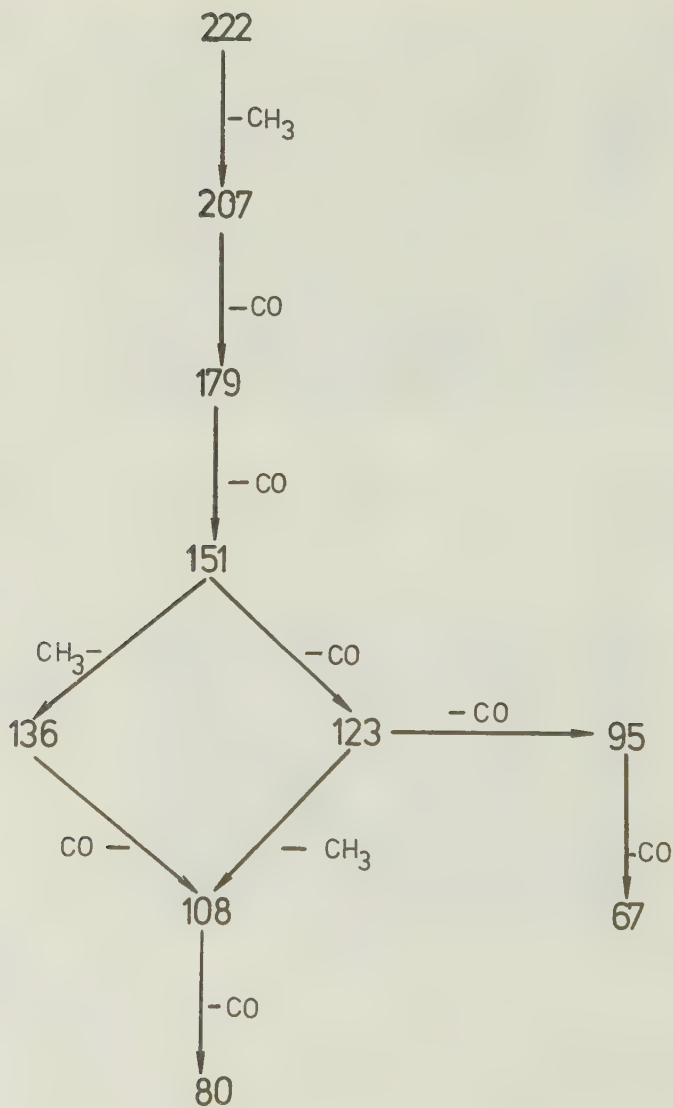


Massenspektrum
des
6,7-Dimethoxy-
Cumarins



Massenspektrum
des
5,7-Dimethoxy-
Cumarins

Abb. 11



Schema 4

Die zur Klärung der Substitution mit herangezogenen Spektren von Isofraxidin und Fraxinol zeigen in der Fragmentierung weitgehend Parallelität, jedoch charakteristische Unterschiede in der relativen Intensität der Anfangsfragmentierung, wie dies Abb. 12 verdeutlicht.

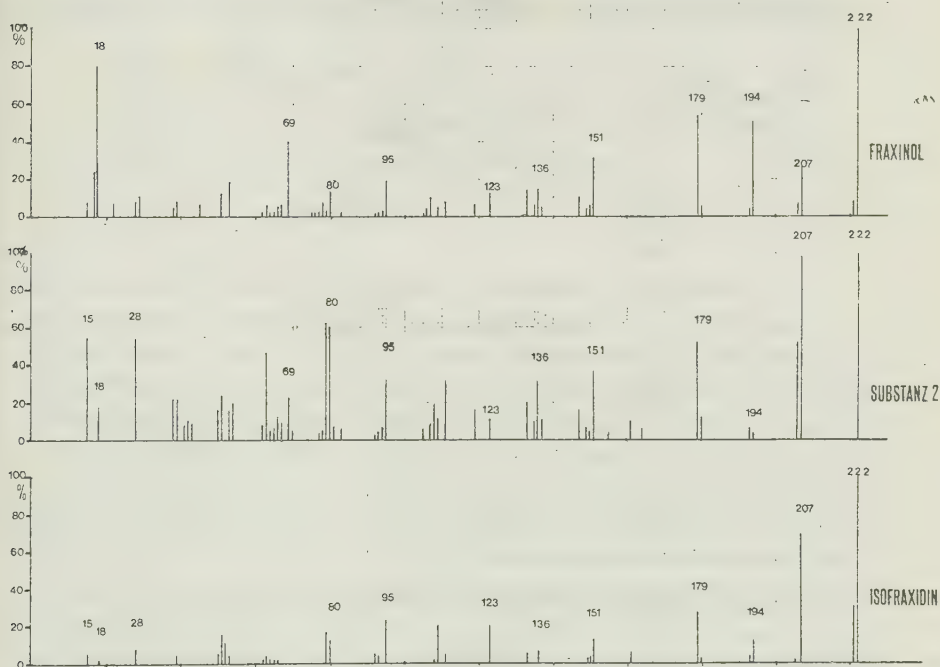
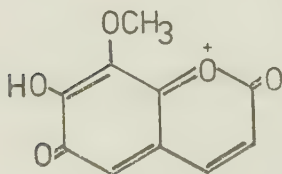


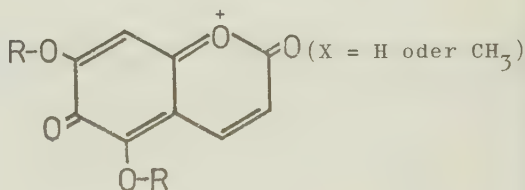
Abb. 12

Massenspektren der trisubstituierten Cumarine Fraxinol, Substanz 2 und Isofraxidin

Substanz 2, ebenso wie Isofraxidin, zeigen den m/e 207 ($M-CH_3$) in der relativen Intensität von 100 bzw. 72%, wogegen der m/e 194 ($M-C=O$) mit 7 bzw. 14% schwach ausgeprägt erscheint. Das hohe Bildungsbestreben, diesen Fragmentierungspeak m/e 207 auszubilden, läßt sich durch parachinoide Strukturen erklären:



Isofraxidin



Substanz 2

Da bei Isofraxidin der m/e 207 durch $M-CH_3$ der 6-Methoxygruppe gebildet wird, ist anzunehmen, daß bei Substanz 2 die gleiche Stellung der Methoxygruppe vorzufinden ist. Unterstützt wird diese Annahme durch das Spektrum des Fraxinols, das in 6-Stellung sein freies Hydroxyl trägt. Hier liegen die Intensitätsverhältnisse fast umgekehrt, so daß sich der m/e 194 ($M-C=O$) mit 54% und der m/e 207 ($M-CH_3$) nur mit 24% zeigt. Die Ausbildung parachinoider Strukturen wird hier durch die Stellung der Substituenten unterdrückt.

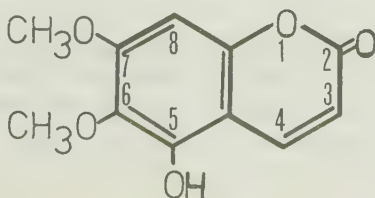
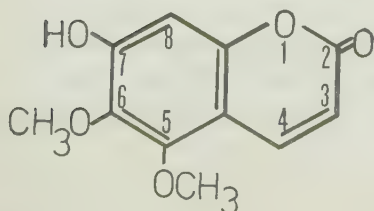
Die weitere Fragmentierung der drei Substanzen geht unter alternierender Abgabe von $M-CH_3$ und $M-C=O$ vor sich. Die Intensitätsunterschiede in den unteren Bereichen sind dahingehend zu interpretieren, daß durch die unterschiedlichen Substitutionsmuster der drei Substanzen bestimmte Ionen in ihrer Bildungswahrscheinlichkeit bevorzugt oder unterdrückt werden (Tab. 7, S. 47).

T a b e l l e 7

Substanz 2	Isofraxidin	Fraxinol
222 (100%) / \ 194 (7%) 207 (99%) 179 (53%) 151 (38%) / \ 136 (33%) 123 (11%) 108 (19%) 95 (32%) 80 (60%) 67 (10%)	222 (100%) / \ 194 (14%) 207 (72%) 179 (25%) 151 (12%) / \ 136 (33%) 123 (21%) 108 (3%) 95 (23%) 80 (12%)	222 (100%) / \ 194 (54%) 207 (24%) 179 (56%) 151 (32%) / \ 136 (4%) 123 (12%) 108 (12%) 95 (20%) 80 (12%)

Das Massenspektrum von Substanz 2 gibt eine gewissen Bestätigung, daß eine der beiden Methoxygruppen in Position 6 anzuordnen ist.

Nach dem Ergebnis der Chromatographie, dem Fluoreszenzverhalten und der spektroskopischen Untersuchungen, die in 7-Stellung eine Hydroxy- oder Methoxygruppe erwarten lassen, bleiben nur noch folgende zwei Strukturvorschläge übrig:

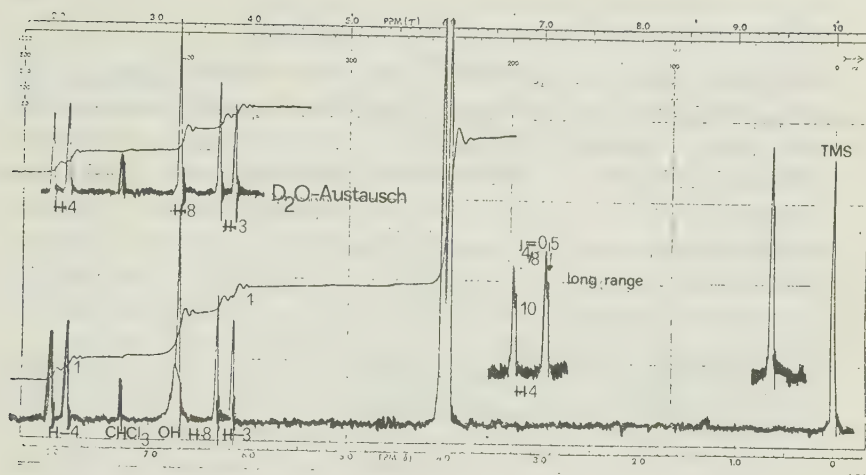


- f) Die NMR-Spektroskopie sollte weitere Anhaltspunkte erbringen. NMR-Untersuchungen über die Zuordnung der Protonen von Cumarinderivaten finden sich bei verschiedenen Autoren^{62,63,64,65,66)}. Eine Übersichtsarbeit mit Zusammenfassungen bei STECK und MAZUREK⁶⁷⁾.

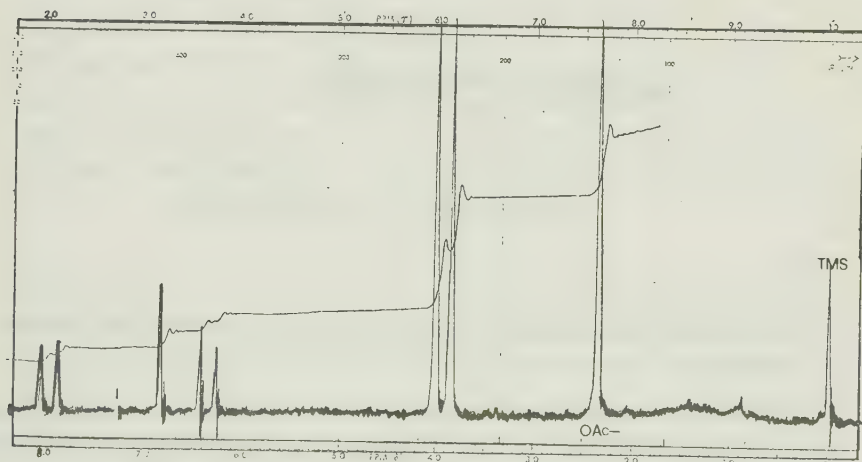
Die chemische Verschiebung der Protonen am C-3 und C-4 charakterisieren den Heterocyclus der Cumarinderivate. Die meisten natürlich vorkommenden Cumarine sind am C-3 und C-4 unsubstituiert und tragen am C-7 eine Sauerstoff-Funktion. Sie bilden typische AB-Systeme aus, wobei ein Protonendublett bei $\delta = 6.1 - 6.4$ ppm dem C-3, das bei $\delta = 7.7 - 8.3$ ppm liegende Protonendublett dem C-4-Proton zugehört. Die cis-Stellung der beiden Protonen beweist die Kopplungskonstante $J_{3/4} = 9.8$ Hz. Cumarine mit einer C-3-Substitution besitzen nur ein H-4-Singulett, das allgemein zwischen $\delta = 7.4 - 7.55$ ppm auftritt. Bei einigen Cumarinen, die nur in einer australischen Pflanzengattung (*Halfordia*) gefunden wurden und sowohl am C-3 als auch am C-4 substituiert sind, gelten die für Cumarine aufgestellten NMR-Regeln nicht mehr.

Substanz 2 zeigt ein Spektrum (Abb. 13, S. 49), das sich zu einem großen Teil analog interpretieren läßt. Die Signale für die H-3- und H-4-Protonen finden sich bei $\delta = 6.24$ (d) und $\delta = 7.94$ (d) ppm, entsprechend einem am C-3 und C-4 unsubstituierten Pyronring. Die Kopplungskonstante von 9.5 Hz beweist die cis-Stellung.

Für Substanz 2 war aus den vorhergehenden Untersuchungen eine 7-Sauerstoff-Funktion anzunehmen. Die richtige Verteilung einer der beiden anderen Sauerstoff-Funktionen ist aus der Lage des Signals für das C-5-Proton ableitbar. Nach REISCH⁶⁸⁾ und MAZUREK⁶⁷⁾ wird sich eine H-4-Resonanz im Bereich von $\delta = 7.9 - 8.2$ ppm finden, wenn eine Sauerstoff-Funktion am C-5 vorhanden ist. Ein C-5-Proton gibt erwartungsgemäß ein Signal bei $\delta = 7.3$ ppm, vorausgesetzt, daß am C-6 ein Wasserstoff gebunden ist. Dies entspricht dem allgemeinen Verhalten ortho-ständiger Protonen in Aromaten. Für sie sind Verschiebungen zu erwarten, die in der Nähe der Benzolprotonen liegen, also zwischen $\delta = 7.3 - 7.4$ ppm.



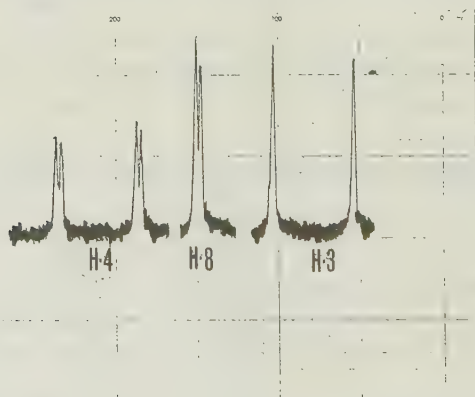
NMR-Spektrum der Substanz 2



NMR-Spektrum des Acetates

Der bei Substanz 2 gefundene Wert von $\delta = 7.93$ ppm entspräche einer Struktur mit einer O-Funktion am C-5.

Nach BREDENBERG und SHOOLERY⁶⁹⁾ bewirkt ein dem aromatischen Proton benachbarter über einen Sauerstoff gebundener Substituent eine diamagnetische Verschiebung des Signals in den Bereich von $\delta = 6.7 - 6.8$ ppm. Für das aromatische Proton von Substanz 2 ergab sich $\delta = 6.73$ ppm. Außerdem wurde eine long-range Kopplung von 0.8 Hz gefunden. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit Angaben von MORITZ und JARVIS⁷⁰⁾, die für $J_{4/8}$ eine long-range Kopplung von 0.6 bis 0.8 Hz festlegten. Diese 4/8-Kopplung erscheint auch in unserem Fall am wahrscheinlichsten, da diese nach MORITZ und JARVIS der "am leichtesten gangbare Zick-Zack-Pfad ist".



Es verbleiben demnach nur C-5, C-6 und C-7 als Orte der O-Substitution.

Die aromatischen Methoxylgruppen geben bis auf wenige Ausnahmen Resonanzen zwischen $\delta = 3.8$ und 4.4 ppm. Die beiden Singulets unserer Substanz fanden sich bei $\delta = 3.95$ und 4.03 ppm.

Über die Lage der beiden Methoxy- und der einen Hydroxygruppe sollte das NMR-Spektrum des Acetates Aufschluß geben.

Die Acetatverschiebung des aromatischen Protons (H-8) lag nur bei etwa $\delta = 0.1$ ppm (Abb. 13, S. 49). Dies ist an sich zu gering für eine ortho-Stellung des Protons zu der freien Hydroxylgruppe. Ein zum Vergleich angefertigtes Spektrum von Scopoletin mit seiner 7-OH-6-OCH₃-Anordnung (Abb. 14, S. 52) zeigt ebenso wie Substanz 2 eine Acetatverschiebung des H-8-Protons von nur 0.1 ppm.

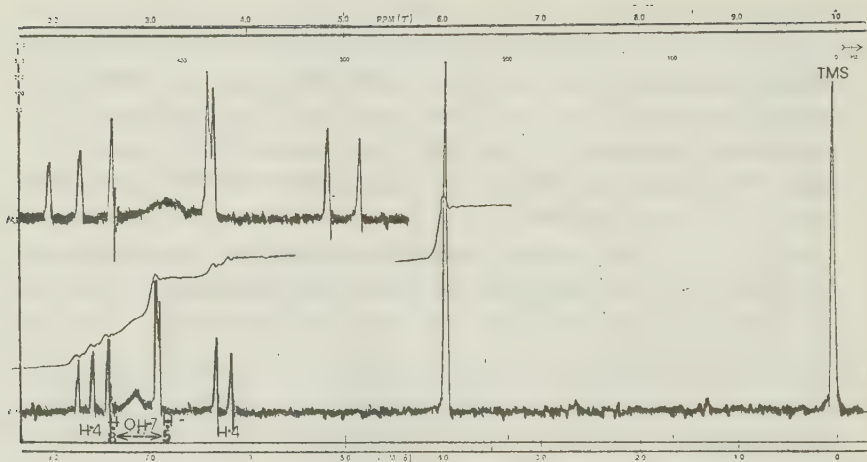
Da Position 6 für die Hydroxylgruppe nicht in Frage kommt - identisch mit dem Substitutionsmuster des Fraxinols - bleibt nur noch Position 5.

Eine Möglichkeit, die para-Stellung des Protons zum Hydroxyl zu beweisen, liefert der GIBB's-Test⁷¹⁾. In Modellversuchen mit Flavonoiden gaben alle Verbindungen mit den entsprechenden Substitutionen positive Ergebnisse.

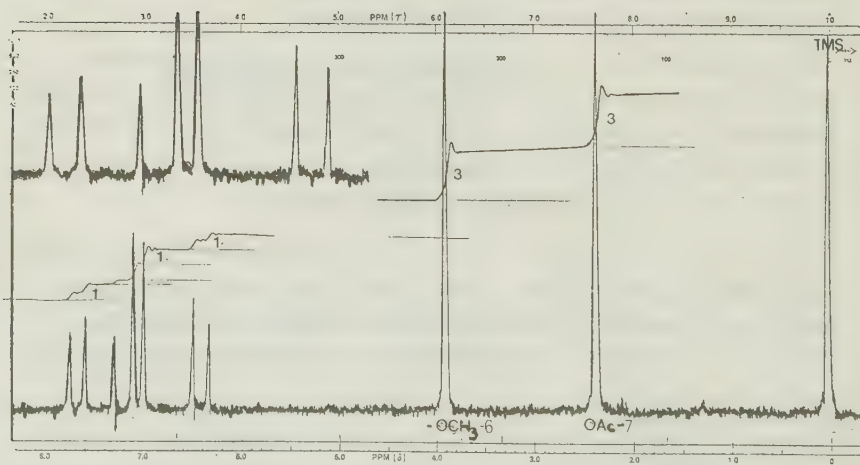
Die Substanz 2 verhielt sich unter denselben Bedingungen widersprüchlich. Von zehn Ansätzen lieferten 7 eine braunschwarze Mischfarbe. Die restlichen drei gaben anfänglich gelblich grüne Färbungen, nach 10 Minuten bildete sich jedoch die charakteristische blaugrüne Färbung.

Wir führten Proben bei verschieden großem Na-acetatzusatz durch, um eine eventuelle Ringöffnung während des Reaktionsablaufes auszuschließen. Die Na-acetatmenge beeinflusste zwar die Farbgebung, aber eine Ringöffnung konnte nicht beobachtet werden. Der GIBB's-Test war somit negativ.

Da auch Scopoletin (Abb. 14, S. 52) eine Acetatverschiebung von etwa 0.1 ppm zeigte, kann eine 7-Stellung des Hydroxyls nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise spielen hier sterische Einflüsse benachbarter Methoxygruppen eine Rolle.

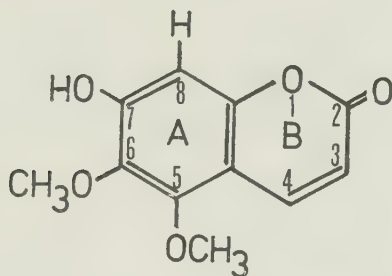


NMR-Spektrum des Scopoletins



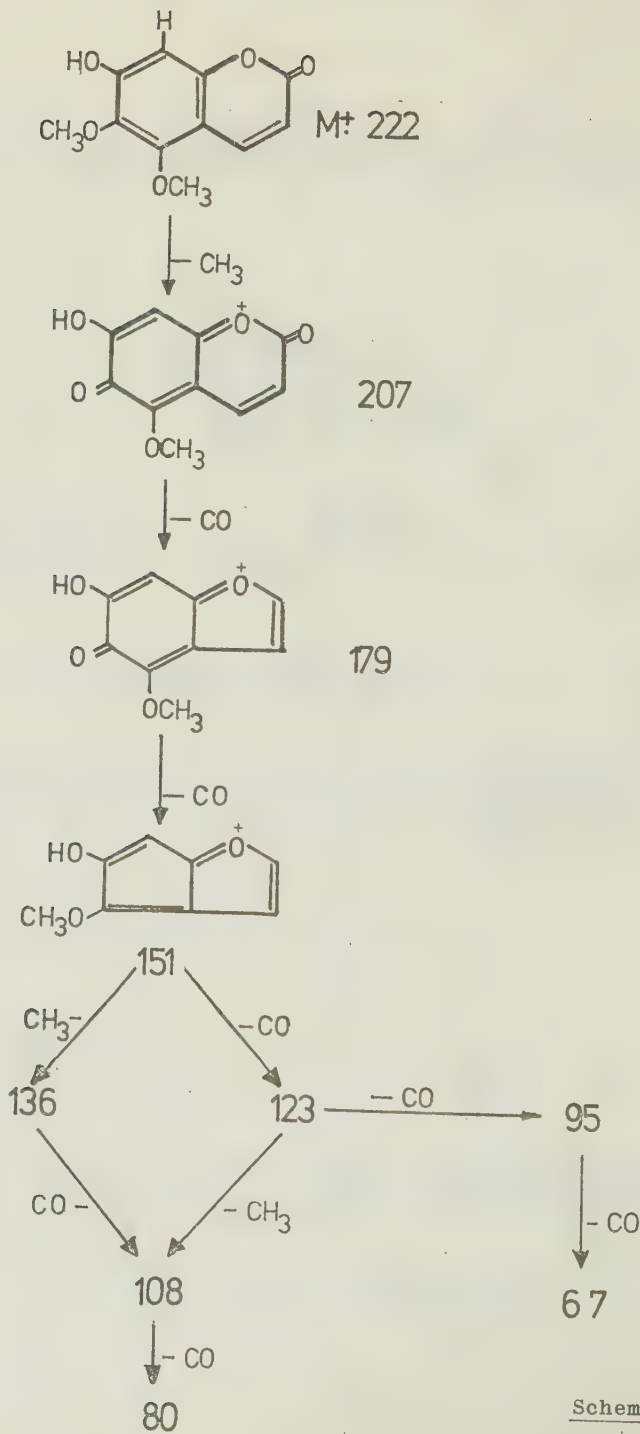
NMR-Spektrum des Scopoletinacetats

Nach Zusammenfassung aller Ergebnisse käme für Substanz 2 ein 7 - H y d r o x y - 5, 6 - d i m e t h o x y - c u - m a r i n in Frage.

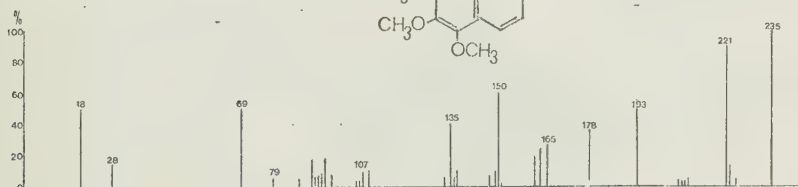
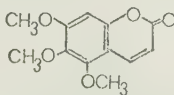
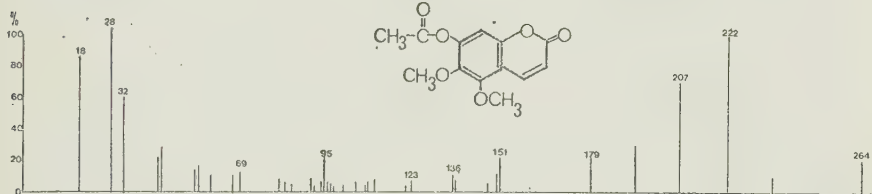
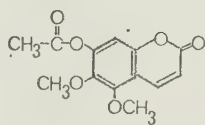
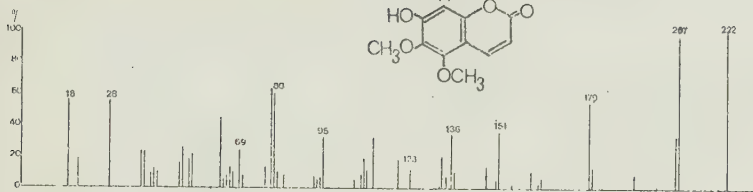
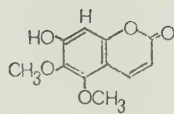


Da unseres Wissens nach ein Cumarin dieses Substitutionstyps noch nicht in Pflanzen gefunden wurde, nennen wir es U m c k a l i n .

Dieses Ergebnis wird durch die Fragmentierung des Umckalins im Massenspektrum bestätigt (siehe Schema 5, S. 54 und Massenspektren S. 55).



Schema 5



Massenspektren des Umckalins und seiner Derivate

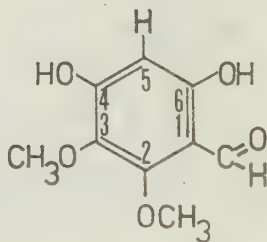
g) Synthese des 5,6,7-Trimethoxycumarins

Die einzigen Cumarine mit einem ähnlichen Substitutionsmuster wie Umckalin sind die aus Fraxinusarten isolierten Verbindungen Fraxinol, Fraxidin und Isofraxidin. Sie wurden von SPÄTH und JERZMANOWSKA⁵⁵⁾ sowie SPÄTH und DOBROVOLNY⁷⁵⁾ synthetisiert.

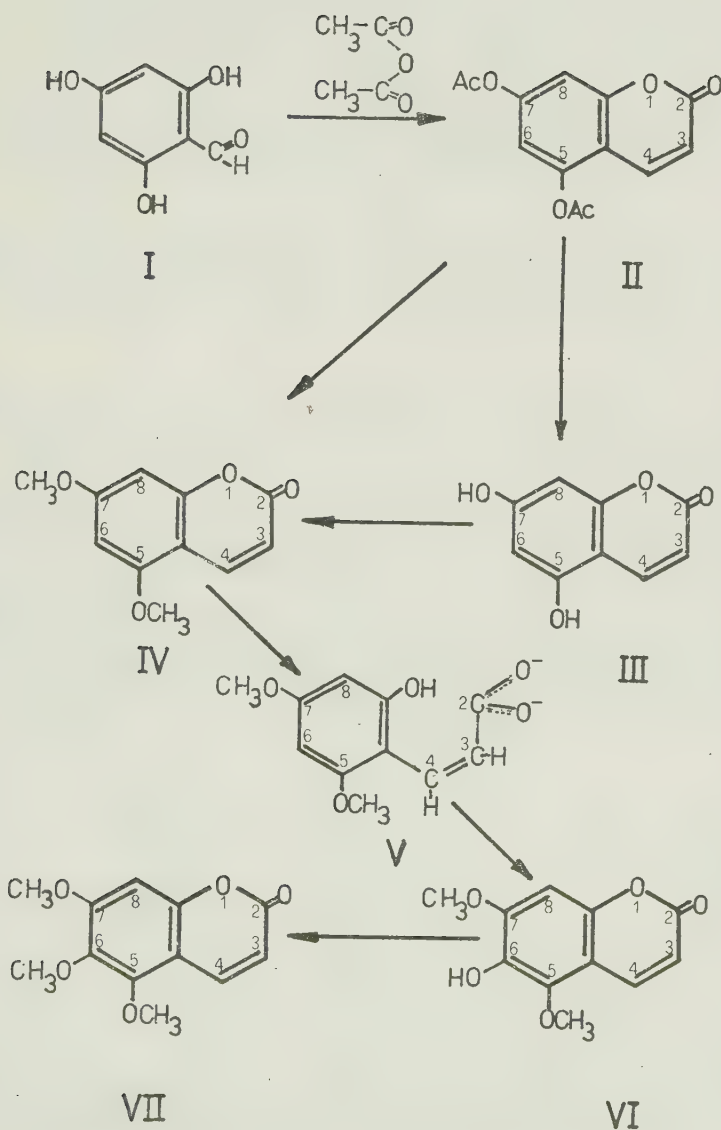
Die Darstellung beruht auf den klassischen Methoden von PERKINS⁷²⁾, die von aromatischen Hydroxyaldehyden ausgehend mit Essigsäureanhydrid/Na-acetat zum Cumarinringsystem schlossen und von PECHMANN⁷³⁾, die entsprechend substituierten Phenoläther mit Apfelsäure in conc. H_2SO_4 kondensierten.

Um stark saure Reaktionsbedingungen zu vermeiden, wurden zahlreiche andere Reagenzien zur Kondensation herangezogen, z.B. Formylessigsäure, HCl, $ZnCl_2$, Phosphorpentoxid und Borfluorid⁷⁴⁾.

Nach diesem Darstellungsschema⁷⁵⁾ konnte bei der Synthese des Umckalins nicht verfahren werden, da das Substitutionsmuster des Umckalins eine 2,3-Methoxygruppe im Hydroxyaldehyd verlangt hätte.



Wir synthetisierten deshalb das 5,6,7-Trimethoxycumarin und versuchten durch partielle Entmethylierung zum 6,7-Dimethoxy-5-Hydroxycumarin zu gelangen.



Synthese des 5,6,7-Trimethoxycumarins

Die Synthese wurde in Abänderung der Vorschriften von BIGINELLI⁷⁹⁾ und SPÄTH und JERZMANOWSKA⁵⁵⁾ durchgeführt. Phloroglucinaldehyd (I) ließ sich mit Essigsäureanhydrid und Na-acetat bei einer Temperatur von 180°C glatt zum entsprechenden 5,7-Acetoxy-Cumarin umsetzen (II). Nach Reinigung an einer Kieselgelsäule in Benzol/Aceton (7:3) wurden feine weiße Kristallnadeln vom Schmelzpunkt 137°C gewonnen. Durch Methylierung nach CATES⁷⁷⁾, METHA und SESHADRI⁷⁸⁾ erhielten wir Limettin⁷⁹⁾ (IV). Die durch direkte Methylierung bzw. nach vorheriger Entacetylierung (III) mit 0.1 n-Na-methylatlösung gebildeten Methylverbindungen schmolzen bei 146 - 147°C.

Die Einführung einer 6-Hydroxylgruppe gelang nach Ringöffnung (V) mit 15%iger Natronlauge und anschließender p-Oxidation nach einer abgeänderten Vorschrift von BIGINELLI (VI)⁷⁶⁾.

Das 6-Hydroxy-5,7-Dimethoxy-Cumarin zeigte in jeder Hinsicht Identität mit Fraxinol, das von SPÄTH und JERZMANOWSKA⁵⁵⁾ aus Trimethoxy-pyrogallol über das Chinon⁸⁰⁾, Hydrochinon, den 2,4-Dimethoxy-3,6-Dihydroxy-Benzaldehyd und Ringschluß mit Essigsäureanhydrid/Na-acetat, synthetisiert wurde.

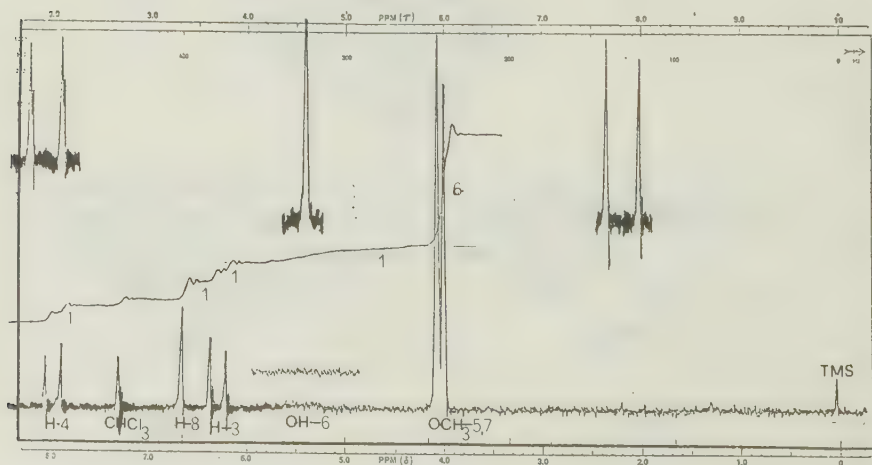


Abb. 15

NMR-Spektrum des 5,7-Dimethoxy-6-hydroxy-cumarins (Fraxinol)

Der Trimethyläther wurde durch erneute Methylierung mit Dimethylsulfat erhalten (VII). Im Mischschmelzpunkt, sowie im NMR-Spektrum (s. Abb. 16) war er mit dem Methylierungsprodukt von natürlichem Umckalin identisch. Damit war gleichzeitig der 5,6,7-Substitutionstyp bewiesen. BIGINELLI⁸¹⁾ gibt für das 5,6,7-Trimethoxy-Cumarin einen Schmelzpunkt von 74 - 75°C, für das 6,7,8-Trimethoxy-Cumarin dagegen 104°C an.

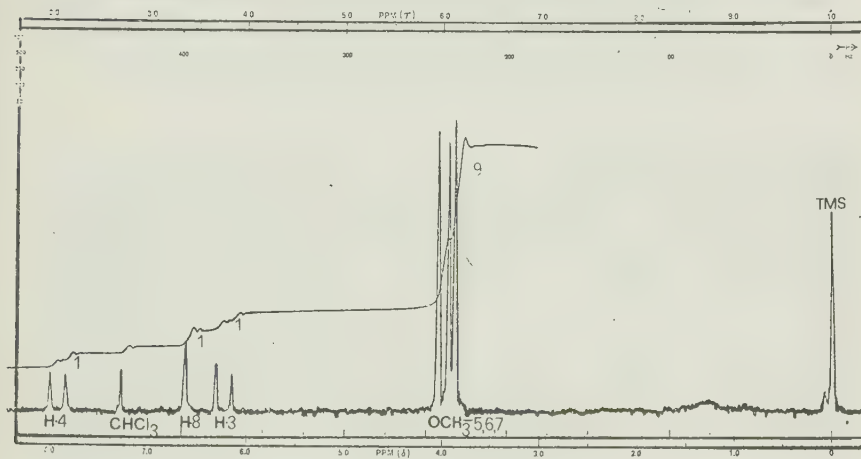


Abb. 16

NMR-Spektrum des 5,6,7-Trimethoxy-Cumarins

- h) Entmethylierung des Trimethoxy-Cumarins nach MANI und VENKATARAMAN⁸²⁾ in Benzol unter Zugabe von AlCl_3 ergaben chromatographisch ein Gemisch von sechs Zonen. Es werden bei dieser Methode praktisch alle Stufen einer Entmethylierung durchlaufen.

Der im R_f -Bereich von Umckalin liegende blau fluoreszierende Fleck ergab ein identisches UV-Spektrum mit authentischem Umckalin, jedoch ist dieses Verfahren zum Strukturbeweis ungenügend. Verschiedene andere Entmethylierungsverfahren z.B. mit Eisessig und conc. HCl ⁸³⁾ ergaben immer das gleiche Gemisch. Eine selektive Entmethylierung von Cumarinpolymethyläthern ist offenbar bei Cumarinen nicht durchführbar.

i) Röntgenstrukturanalyse

Die Verbindung kristallisierte aus Äthylacetat/abs. Äthanol (3:1). Die gelblichen durchsichtigen Kristalle hatten im Durchschnitt eine Größe von $1 \times 0.6 \times 0.2$ mm. Mittels photographischer Aufnahmen auf der Precession- und Weissenberg-Kamera konnten die Elementarzellenabmessungen bestimmt werden.

Der Kristall erwies sich als monoklin mit der Raumgruppe $P 2_1/c$ und hatte folgende Zellkonstanten:

$$\begin{aligned} a &= 7.911 \pm 0.01 \text{ \AA} \\ b &= 15.748 \pm 0.02 \text{ \AA} \\ c &= 8.293 \pm 0.01 \text{ \AA} \\ B &= 94.5^\circ \pm 0.2^\circ \end{aligned}$$

Die Elementarzelle hat ein Volumen von $1030 \text{ \AA}^3$.

$$v = a \cdot b \cdot c \cdot \sin B$$

Die Dichte wurde mittels der Schwebemethode in einer Mischung aus Kaliumbromid und Kaliumjodid bestimmt und beträgt bei 20°
 $\rho = 1.39 \pm 0.03 \text{ g/ccm}^3$.

Mit dem Molukulargewicht 222.20 für ein Molekül erhält man, unter der Annahme von 4 Molekülen in der Elementarzelle, eine Dichte von 1.43 g/cm^3 . Die Annahme von 4 Molekülen war somit richtig.

$$\text{Kristalldichte} = \frac{888}{(0.6022)(1030)} = 1.43$$

====

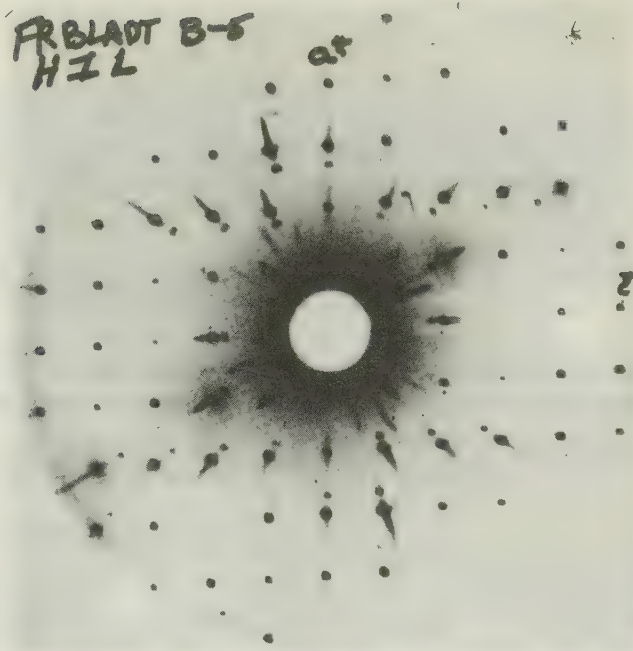
Auf einem automatischen Einkristalldiffraktometer wurden 1934 unabhängige Reflexe mit der 5-Punktmeßmethode gemessen.

Die Meßdaten wurden in der üblichen Art (Wilson-Statistik) skaliert.

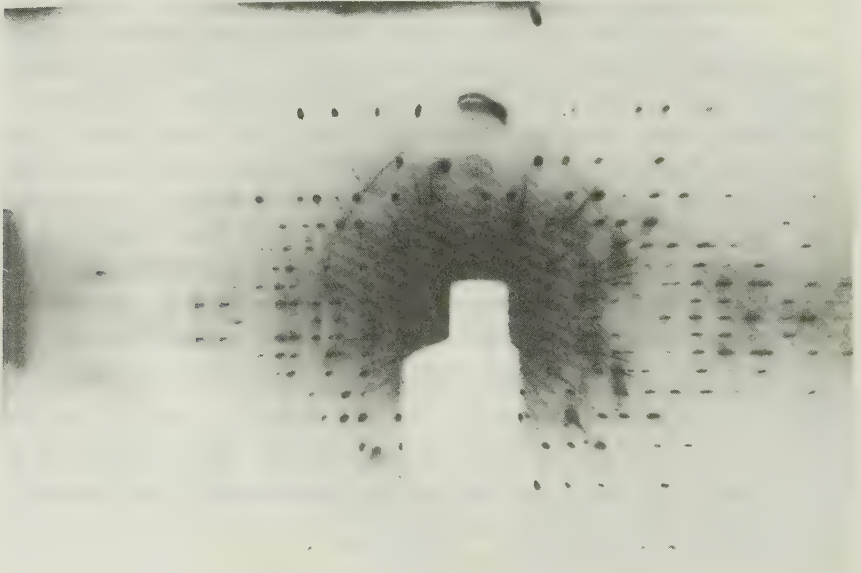
Die Phasen der 206 höchsten sogenannten normalisierten Strukturfaktoren E wurden mit der direkten Methode nach ZECHMEISTER⁸⁴⁾ bestimmt. Drei feste Phasen (Ursprungsfestlegung) und fünf variable Phasen wurden als Startsatz bei dieser Phasenbestimmung ("multisolution method") verwendet.

Eine Fouriersynthese unter Benutzung dieser 206 E's ergab die gesamte Struktur. Die beiden Methylgruppen wurden jedoch zu diesem Zeitpunkt noch in Frage gestellt. Um sie zu bestätigen, wurde eine neue Fouriersynthese gerechnet, und zwar mit sämtlichen Reflexen unter Benutzung der Lagen aller Ring-Kohlenstoffatome und der 5 Sauerstoffatome. Diese Fouriersynthese zeigte deutlich die beiden verbleibenden Methylgruppen an. Isotrope Verfeinerung der Lagen aller Atome (außer den Wasserstoffen), sowie der Parameter der Temperaturschwingungen, ergab den üblichen R-Faktor, der ein Maß für die Genauigkeit der vermessenen Daten darstellt, von 16.9%. Anschließende Verfeinerung der anisotropen Temperaturschwingungen lieferte einen R-Faktor von 12.1%.

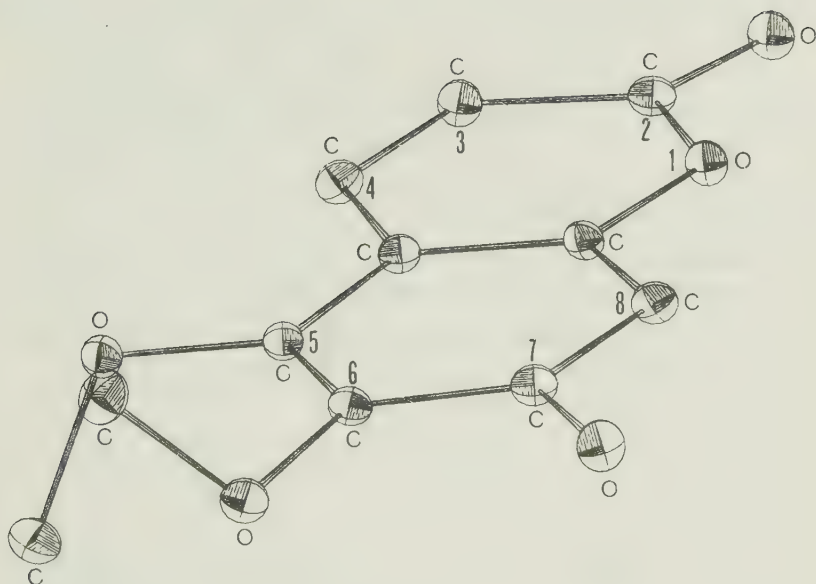
Zu diesem Zeitpunkt zeigte eine neuerliche Fouriersynthese die endgültige Position aller Ring-Wasserstoffe und Wasserstoffe der Methylgruppe auf.



Aufnahme der ersten Schichtlinie (H 1 L) mit der Precessions-Kamera



Oszillationsaufnahme mit der Weissenberg-Kamera



Molekülansicht (ohne Wasserstoffe)

Projektion auf die kristallographische Y-Z-Ebene

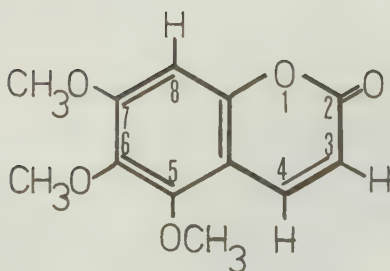
3. Identifizierung von Umckalinmonomethyläther

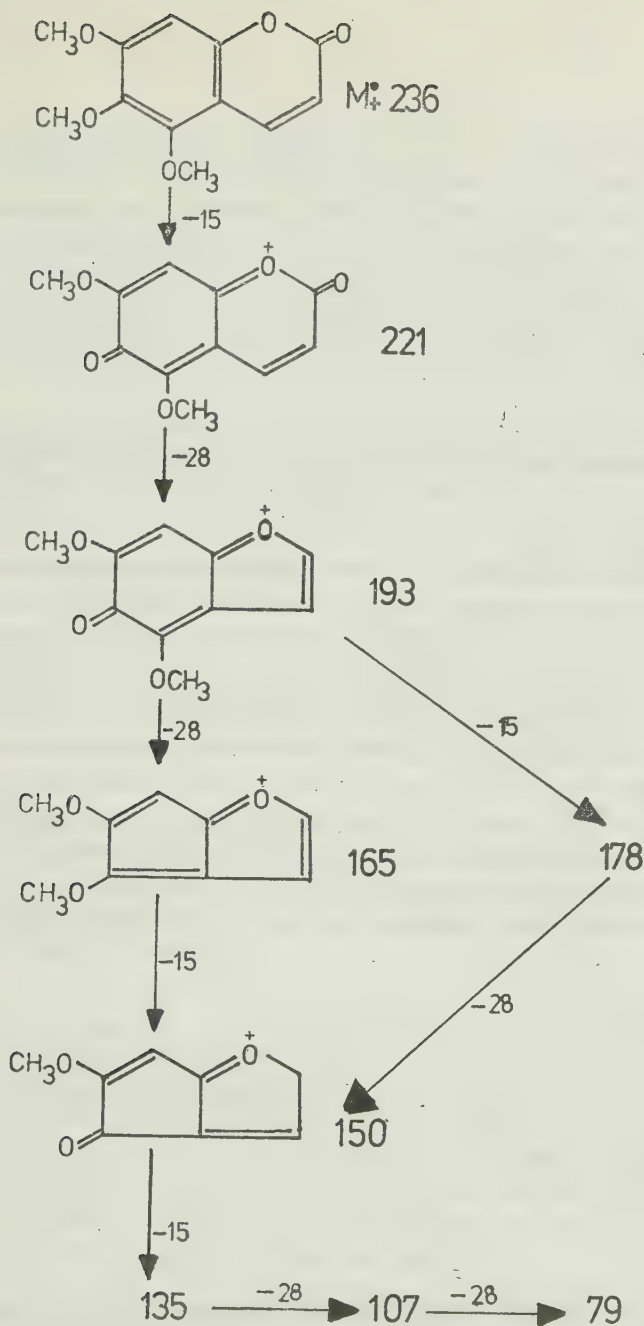
Bei der Isolierung des Umckalins fiel in einer Mischfraktion eine braungelb fluoreszierende Zone auf, die gleich Laufeigenschaften wie der synthetische Umckalin-mono-methyläther hatte.

Alle Fraktionen, die diese braune Zone enthielten, wurden gesammelt und über Kieselgelplatten mit Toluol/Äthylacetat (5:4) getrennt. Eine für ein Massenspektrum ausreichende Substanzmenge lieferte gleiche Fragmentierung wie das authentische Syntheseprodukt (Schema 6, S. 65).

Die Fragmentierung verläuft in der bekannten Weise durch alternierende Abspaltung von $M-C=O$ bzw. $M-CH_3$.

Somit liegt in der Droge neben Umckalin auch sein vollmethyliertes Produkt vor.





Schema 6

Fragmentierung des Umckalin-7-monomethyläthers

4. Isolierung und Identifizierung von Substanz 3 (Scopoletin)

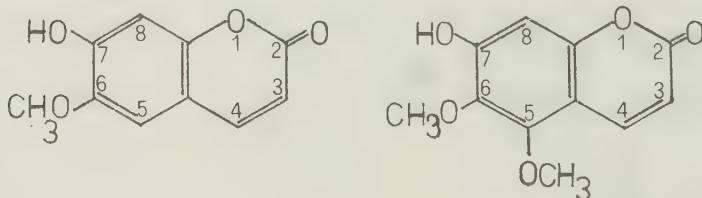
Im Acetonauszug und im methanolischen Gesamtextrakt war neben Umckalin chromatographisch eine blauviolette Zone nachweisbar, die gleiches Fluoreszenz- und Chromatographie-Verhalten mit authentischem Scopoletin zeigte. In vier verschiedenen Laufmittelsystemen hatte die Substanz 3 nahezu übereinstimmende R_f -Werte mit Scopoletin.

Die Abtrennung der Substanz 3 von Umckalin, Säuren o.ä. gelang an einer Kieselgelsäule mit Benzol/Aceton (7:3). Die Substanz fiel trotz verschiedener Reinigungsversuche, u.a. über Aluminiumoxid, immer als gelbbrauner schmieriger Rückstand an.

Erfolgreich war die präparative Kieselgel-DC im System Toluol/Äthylacetat (5:4). Die nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat-, Aceton- und Äthermischungen erhaltenen feinen gelblich-weißen Kristallnadeln vom Schmelzpunkt 205°C zeigten mit authentischem Scopoletin keine Schmelzpunktsdepression.

Die UV- und IR-Spektren waren mit authentischem Scopoletin deckungsgleich.

Scopoletin, wie Umckalin in 7-Stellung mit einer Hydroxy- und in 6-Stellung mit einer Methoxy-Gruppe substituiert, ist auf Grund biogenetischer Zusammenhänge nicht auf bestimmte Pflanzenfamilien beschränkt, sondern über das ganze Pflanzenreich verteilt.



Cumarine sind z.B. in der Familie der Leguminosen, Rutaceen, Labiaten, Kompositen und Umbelliferen nachgewiesen worden. Bei den sehr artenreichen Geranieae, die etwa 375 Geranium-

260 Pelargonium-, 75 Erodium-, 30 Monsonia- und 6 Sarcocaulon-Vertreter aufweisen, sind sie bisher noch nicht festgestellt worden.

Da die beiden Cumarine, Umckalin und Scopoletin, in den Wurzeln aller von uns untersuchten Pelargoniumarten (s. Abb. 4, S. 19) frei bzw. in Glykosidform vorliegen, könnte ihr Vorkommen für Pelargoniumarten charakteristisch sein.

5. Isolierung und Identifizierung von Substanz 6 (CICHORIIN-6-MONOMETHYLÄTHER, SCOPOLIN)

Wie Hydrolyseversuche (Abb. 8, S. 26) ergeben haben, liegt in dem unhydrolysierten methanolischen Extrakt die als Scopoletin identifizierte Substanz 3 in Form eines Glykosides vor.

Das bekannte 7-O-Glucosid des Scopoletins, der Cichoriin-6-Monomethyläther wurde zu Vergleichszwecken aus Radix Scopolia isoliert. Zone 6 (s. Abb. 6, S. 21) zeigte mit der Testsubstanz gleichen R_f (0.45 in BEW 4:1:2) und nach Anreicherung und Trennung über Kieselgelsäulen und -platten ein identisches UV-Spektrum. Da die UV-Spektren von Aesculin, Cichoriin, Aesculin-7-monomethyläther und Cichoriin-6-monomethyläther ähnliche Hauptmaxima zeigen, hydrolysierten wir Substanz 6 mit 2n-HCl zum Aglykon. Im DC waren einwandfrei Scopoletin und Glucose nachweisbar.

6. Identifizierung eines 7-O-Glucosides des Umckalins (Umckalosid)

a) Isolierungsversuch

Wie das Scopoletin sollte auch Umckalin im methanolischen Gesamtextrakt in Form des 7-O-Glucosides vorliegen, da ein im UV-366 nm braun fluoreszierender Substanzfleck (R_f = 0.6 in BEW 4:1:2) (s. Abb. 6, S. 21) durch saure Hydrolyse in Umckalin und Glucose aufspaltete.

Eine Trennung der darunterliegenden stark blau fluoreszierenden Zone war nur in sauren Laufmittelsystemen möglich.

Dies hatte aber bereits bei der Anreicherung der Zone durch Plattenchromatographie eine teilweise Abspaltung des Zuckers zur Folge. Das Glykosid wurde bei der Elution aus der Kieselgelschicht teilweise gespalten.

Eine Säulenanreicherung unter Vermeidung saurer Laufmittelsysteme brachte erwartungsgemäß ein Gemisch des Glykosides mit der darunterliegenden Zone. Trennversuche an verschiedenen Adsorbentien scheiterten. Wir acetylierten deshalb das Substanzgemisch und trennten über Kieselgelschichten mit neutralen Laufmittelsystemen. Zwei bräunlich fluoreszierende Hauptflecke lagen in Äthylacetat/Methanol/Wasser (100:17:13) im mittleren R_F -Bereich. Im System Äthylmethylketon/Benzol (3:7) verblieb einer der beiden Flecken am Startpunkt. Die durch Elution aus der Platte erhaltene Substanz lieferte kein eindeutiges Spektrum.

- b) Eine Synthese des 7-O-Glucosides schien daher notwendig. Die für die meisten Cumarine beschriebenen Glykosidierungsmethoden gehen auf MAUTHNER⁸⁵⁾ und KOENIGS-KNORR⁸⁶⁾ zurück. MAUTHNER kondensierte das entsprechende Cumarin in einer wässrig-acetonhaltigen Lösung in Gegenwart von Natronlauge mit β -Acetobromglucose. KOENIGS-KNORR kuppelte in einer Chloroformlösung unter Zugabe von Silbercarbonat und Chinolin. Die gebildeten Tetraacetylzucker werden meist mit Bariumhydroxid, trockenem Ammoniak o.ä. geschüttelt und zum Glucosid verseift.

Zur Erprobung beider Methoden führten wir Zuckerkupplungen mit Aesculetin durch.

Durch Abänderung der Laugenkonzentration und Trennung des Reaktionsproduktes über Kieselgelsäulen brachte die MAUTHNER-Synthese das Tetraacetylchioriin in Ausbeuten von 60%. Die mit katalytischen Mengen von Na-methylat durchgeführte Spaltung in Cichoriin war im Gegensatz zu MAUTHNER, der mit trockenem Ammoniak arbeitete und mehr als 24 Stdn. benötigte, bereits nach 30 Minuten vollzogen.

Die KOENIGS-KNORR-Synthese brachte bessere Ausbeuten (73%).

Wir kuppelten Umckalin nach einer von uns modifizierten KOENIGS-KNORR-Methode. Nach 48 Stdn. setzte sich nach chromatographischer Überprüfung kein weiteres Aglykon mehr um. Das Kupplungsprodukt war nach mehrmaligem Ausschütteln mit Petroläther frei von Chinolin und ließ sich über Kieselgelsäulen im System Benzol/Methanol (9:1) fraktionieren. Das Tetraacetylprodukt kristallisiert aus absolutem Alkohol in Form feiner weißer Nadeln vom Schmelzpunkt 127°C .

Im NMR-Spektrum (Abb. 17) fanden sich neben den bekannten Umckalin-Protonen die typischen Signale des Zuckeranteils.

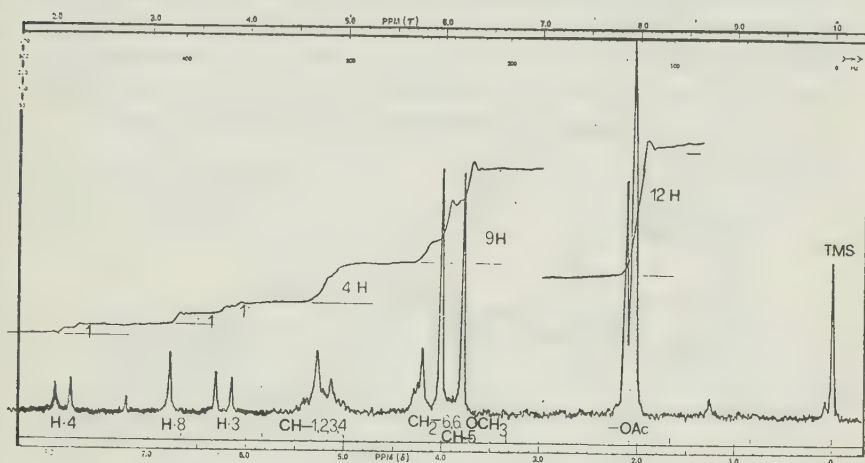


Abb. 17

NMR-Spektrum des Umckalin-tetraacetyl-glucosids

Das Tetraacetylglucosid zeigte im UV-366 nm eine schwach blaue Fluoreszenz. Nach Besprühen mit Pyranin (= 3-Hydroxy-5,8,10-trihydroxysulfonsaures Natrium) erschien es als dunkelblaue Zone auf hellgrün fluoreszierendem Plattenhintergrund.

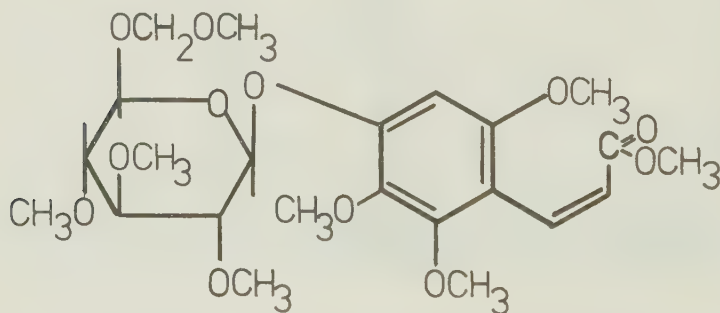
Der dünnschichtchromatographische Vergleich mit dem gemeinsam angereicherten und acetylierten Gemisch der Zonen 4 und

5(siehe a) Isolierungsversuch) zeigte, daß Substanz 4-Acetat mit dem synthetischen Tetra-acetylglucosid gleiche Laufeigenschaften aufwies (s.Tab.19, S.126).

Die O-glucosidische Bindung des Kupplungsproduktes war jedoch so labil, daß sie schon bei der Umkristallisation aufspaltete und teilweise Aglykon lieferte.

Auch vorsichtiges Entacetylieren mit katalytischen Mengen Na-methylat führte zum größten Teil bereits zum Aglykon. Durch Säulentrennung konnte schließlich eine zur Massenspektroskopie ausreichende Menge an Umckalin-7-O-Glucosid gewonnen werden. Diese wurde in Form des methylierten Produktes aufgenommen.

Der Massenpeak bei 486 sprach dafür, daß bei der Methylierung eine Ringöffnung stattgefunden hatte, wie dies oftmals bei Flavon- und Cumarin-Glykosiden⁸⁷⁾ beobachtet wird (Abb. 18, S. 71).



Der Basepeak von m/e 268 (100%) stellt somit die methylierte Umckalinsäure dar. Diese geht unter Abgabe der Methylestergruppe in den m/e 237 Peak über.

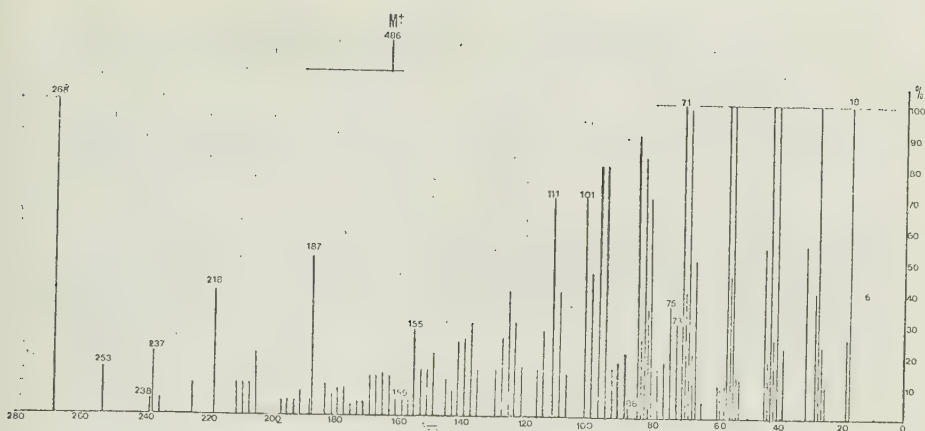
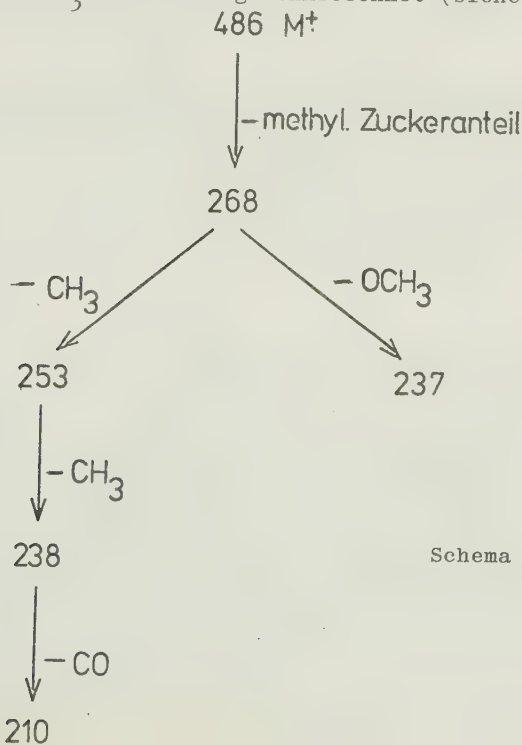


Abb. 18

Massenspektrum des methylierten Umckalosids

Die restliche Fragmentierung ist wieder durch wechselweise Abspaltung von $M-CH_3$ und $M-C=O$ gekennzeichnet (siehe Schema 7).



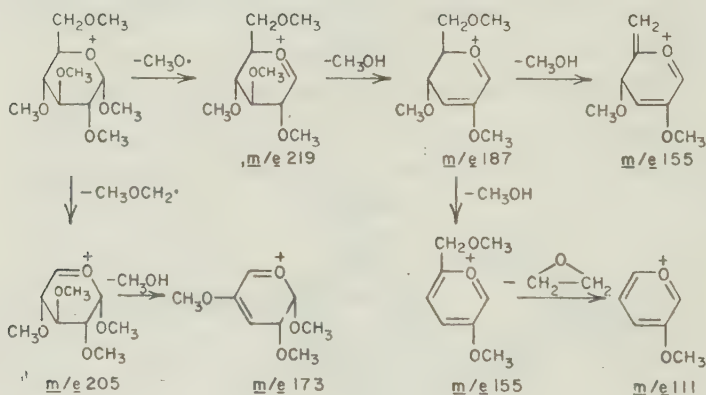
Schema 7

Die Fragmentierung des Zuckers wird aus den typischen Bruchstücken m/e 187 (50%), m/e 155 (28%) und m/e 111 (70%) deutlich (Schema 8).

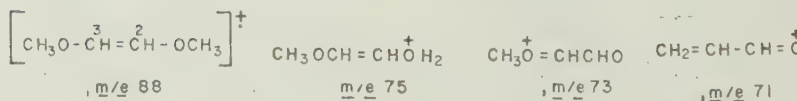
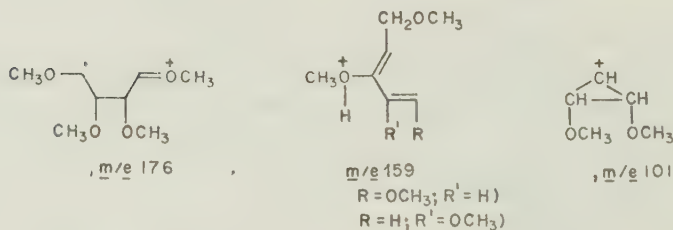
Der m/e 101 (71%) leitet sich von einem substituierten 3-Kohlenstoffring ab.

Das Fragmentation m/e 127 geht aus m/e 159 unter Verlust von Methanol hervor:

Weitere charakteristische Spaltprodukte, die Ionen m/e 88, m/e 75, m/e 73, m/e 71 sind den im Schema 8 angegebenen Fragmenten zuzuordnen.



Schema 8



7. Versuche zur Charakterisierung von Substanz 5

Die in BEW stark blau fluoreszierende Zone 5 ($R_f = 0.5$) zeigte nach Zusatz von Alkali eine intensiv grünblaue Fluoreszenz.

Durch Säulenchromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2) konnte Zone 5 angereichert werden. Die eingeeengten Fraktionen wurden anschließend mit Wasser extrahiert. Trotz mehrfacher Reinigungsversuche gelang es nicht, die im Tageslicht fluoreszierende Substanz zur Kristallisation zu bringen. Nach Reinigung über Kieselgelplatten verblieb ein gelblich-weißes Pulver, dessen UV-Spektrum durch ein starkes Hauptmaximum bei 323 nm und einer Schulter bei 255 nm charakterisiert war (Abb. 19).

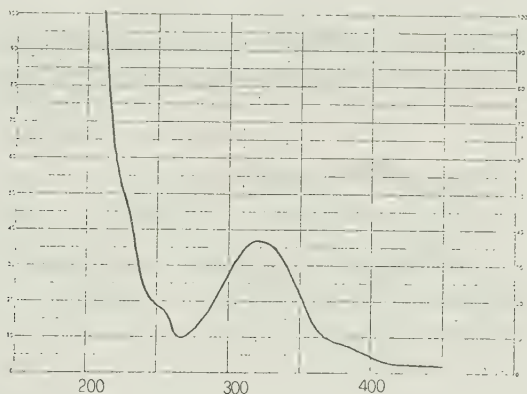


Abb. 19

UV-Spektrum von Substanz 5

Das IR-Spektrum zeigte eine Schlüsselbande bei 3400 cm^{-1} , die nach Lage und Breite einer Carbonsäure zugeordnet werden könnte. Bei 1675 cm^{-1} erschien eine Carbonylbande. Bei 1480 cm^{-1} und 1585 cm^{-1} eine Aromatenbande.

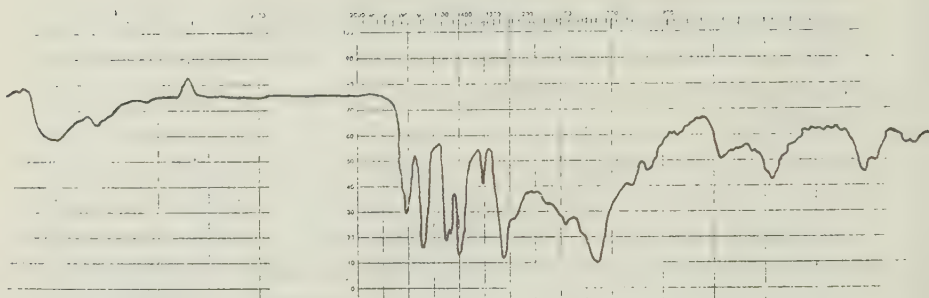
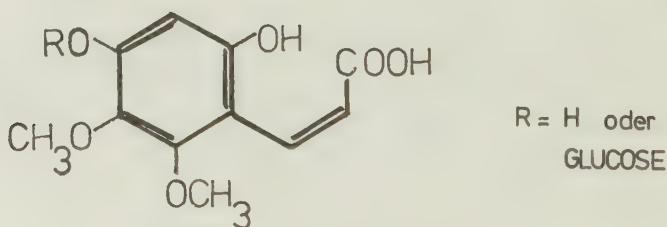


Abb. 20

IR-Spektrum von Substanz 5

Aus den Angaben des UV- und IR-Spektrums war abzuleiten, daß möglicherweise die offenkettige Form, die "Umckalinsäure" vorlag.



Strukturvorschlag

8. Isolierung bzw. chromatographische Identifizierung von
Kaffeesäure, Chlorogensäure, p-Cumarsäure, Protokatechu-
säure und Phloroglucin

Bei verschiedenen Chargen der Droge, die aus unterschiedlichen Wachstumsgebieten und -perioden gesammelt worden waren, ließ sich in den Chromatogrammen der Ätherauszüge zusätzlich

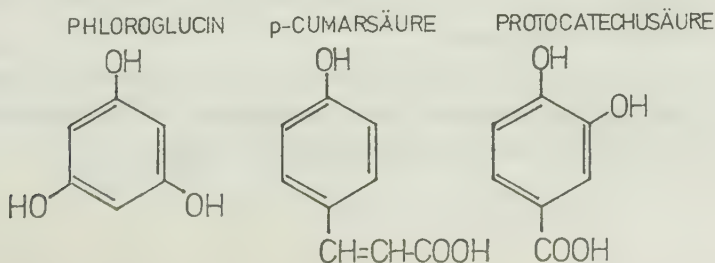
zu den beschriebenen Aglykonen eine im UV-366 nm blau fluoreszierende Verbindung nachweisen. Das chromatographische Verhalten war in Übereinstimmung mit authentischer Kaffeensäure. Fluoreszenz- und Farbänderungen nach Behandlungen mit verschiedenen Reagenzien deutete ebenfalls auf Kaffeensäure hin (s. Tabelle 20, S.131). Eine Isolierung gelang durch präparative Papierchromatographie (Butanol/Wasser gesättigt). Die konzentrierte Lösung zeigte im UV-Spektrum die beiden typischen Maxima bei 242 nm und 326 nm. Nach Reinigung über eine Perlonsäule und Umkristallisieren aus Äthanol schmolzen die feinen gelben Nadeln bei 195°C⁸⁸⁾. Da Kaffeensäure nicht in allen untersuchten Chargen auftrat ist denkbar, daß hier Standortunterschiede, Erntezeit, Boden- und Temperatureinflüsse eine entscheidende Rolle spielen. Dieser Gedanke liegt nahe, da zwischen Cumارين und Zimtsäuren eine biogenetische Verwandtschaft besteht. Die leichte Umwandlung der Zimtsäuren in Cumarine⁸⁹⁾, das gehäufte Auftreten beider Verbindungen in einer Pflanze⁹⁰⁾ und die Umwandlung von radioaktiver Kaffeensäure in Scopoletin⁹¹⁾, sind hierfür beweisend.

Eine Isolierung von Chlorogensäure ließ sich aus dem wässrigen Drogenextrakt erreichen.

Nach der Trennung über eine kleine Perlonsäule⁹²⁾ gewannen wir eine zur UV-Messung ausreichende Menge Substanz, die zwei charakteristische Maxima bei 245 nm und 322 nm zeigte.

Die Na-acetatverschiebung war mit den Literaturangaben in Übereinstimmung (siehe Tabelle 21, S.131).

Durch chromatographischen Vergleich mit authentischen Testsubstanzen auf Zellulose-, Polyamid- und Kieselgelschichten ließen sich p-Cumarsäure, Protocatechusäure und Phloroglucin nachweisen^{93,94)} (siehe Tabelle 22, S.132).



9. Isolierung und Identifizierung von Quercetin und Kämpferol

Nach Besprühen des Dünnschichtchromatogramms des methanolischen Gesamtextraktes mit Naturstoffreagenz/PÄG, traten im R_f -Bereich 0.85 - 0.9 (BEW 4:1:2) zwei orangegelb- bzw. grün-gelbe Zonen auf, deren Farben typisch für die Flavone Quercetin und Kämpferol waren.

Aus der angereicherten Aglykonfraktion trennten wir über Kieselgel mit Chloroform/Toluol/Aceton (25:40:35)⁹³⁾ die beiden Aglykone und reinigten die eluierten Zonen nochmals im gleichen System. Die UV-Spektren und Chromatogrammvergleiche waren beweisend (siehe Tabelle 23, S.134).

Im oberen R_f -Bereich des Flavonlaufmittels (Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser 10:2:3) waren im Gesamtextrakt der Droge außerdem zwei Kämpferol-Monoglykoside nachweisbar, die sich durch chromatographische Vergleiche als Kämpferol-3-O-Glucosid (Astragalin) und Kämpferol-7-O-Rhamnosid identifizieren ließen.

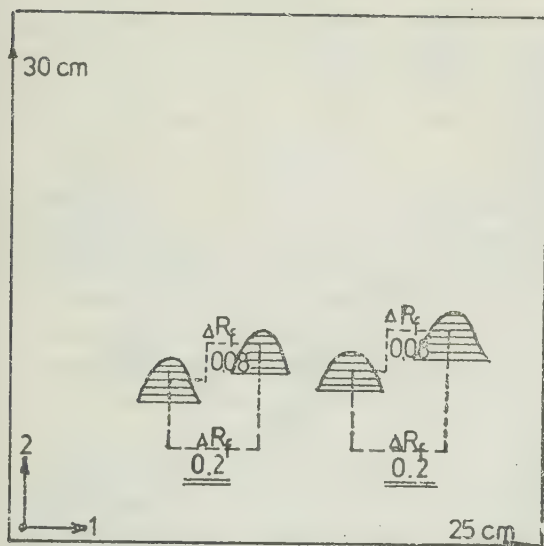
10. Untersuchung des Gerbstoffanteils der Pelargoniumwurzeln

a) Identifizierung der Katechine

Eine positive Eisen-III-chlorid-Reaktion zeigte das Vorliegen von Gerbstoffen an. Zur Aufklärung seiner genauen Zusammensetzung verwandten wir die Gegenstrom-Verteilungsmethode zwischen Äthylacetat und Wasser. Die Oberphase löst Cumarinderivate und andere niedermolekulare phenolische Verbindungen, während in der Unterphase die kondensierten Tannine zurückgehalten werden.

Nach einer 10-Stufentrennung wurden die einzelnen Ober- und Unterphasen des ausgewählten Pelargonium reniforme Extraktes getrennt zur papierchromatographischen Untersuchung herangezogen.

In der Oberphase 3 und 4 konnten durch zweidimensionale Papierchromatographie und verschiedene Sprühreagenzien 31,95,96) 4 Katechine nachgewiesen werden.



R_f Substanz

0.57 Gallokatechin
0.37 Epigallokatechin

0.20 (ΔR_f)
====

0.86 Katechin
0.66 Epikatechin

0.20 (ΔR_f)
====

Abb. 21

Zweidimensionale Papierchromatographie der Oberphase 4

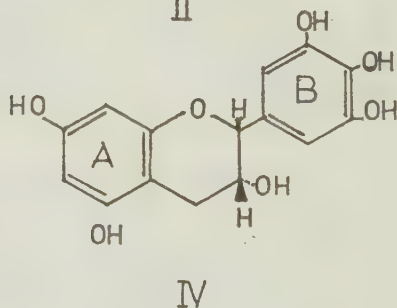
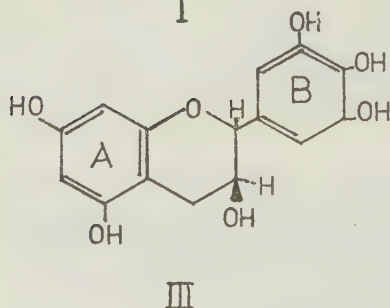
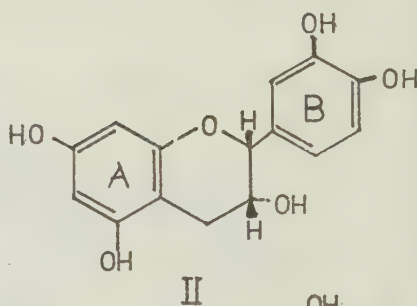
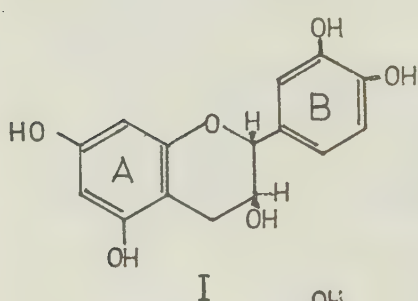
1. Laufrichtung: sek. Butanol/ H_2O gesättigt

2. Laufrichtung: 2%ige Essigsäure

Detektion: Benzidin-Reagenz

Es handelt sich um:

- I = (+)-Katechin (2R, 3S)-5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavon-3-ol)
- II = (-)-Epikatechin
- III = (+)-Gallokatechin
- IV = (-)-Epigallokatechin



Die typische Anordnung der beiden Substanzpaare auf dem Chromatogramm und die positive Reaktion mit Benzidin-, amalgmiertem Silbernitrat- und p-Toluolsulfonsäurereagenz fand sich in fast allen untersuchten Pelargoniumarten. Die Konzentrationen der nachweisbaren Katechine in den einzelnen Extrakten war sehr unterschiedlich.

b) Untersuchung der Leukoanthocyanidine

Nach BATE-SMITH und LERNER³²⁾ ist die Bildung von Leukoanthocyanidinen mit einem holzigen Wachstum von Pflanzen verbunden. LA fungieren als Vorstufen von Flavonoiden, Anthocyanidinen und Tanninen.

Nach HILLIS⁹⁷⁾ findet bereits im Holz eine enzymatische Oxydation der LA unter schwach sauren Bedingungen statt: Die Flavan-3,4-Diole⁹⁸⁾ bilden hauptsächlich Cyanidin^{99,100)} (ca. 85%), in geringer Menge Delphinidin, während die anderen Formen der Hydroxylierung fast gänzlich abwesend sind.

Eine gezielte Hydrolyse ergab bei allen untersuchten Pelargoniumwurzeln ein blutrot gefärbtes Hydrolysat, dessen Ätheraus-schüttelung tiefviolette Farbe zeigte. Der Farbwechsel von farblos nach rot gab den Leuko-Komponenten ihren Namen. Durch Anwendung alkoholischer 3n-HCl wird vermieden, daß die Hauptmenge des vorliegenden Materials in Polymere oder "Phlobaphene" umgewandelt wird, was in wässrigen Säuren immer der Fall ist. Die sonst hierbei gebildeten Phlobaphene ziehen sich auf dem Papierchromatogramm bis zum R_f -Wert des monomeren Produktes hin. Die gebildeten Phlobaphene waren in allen Stufen der Polymerisation gegenwärtig und lieferten nach Behandlung mit alkoholischer HCl wiederum Anthocyanidine.

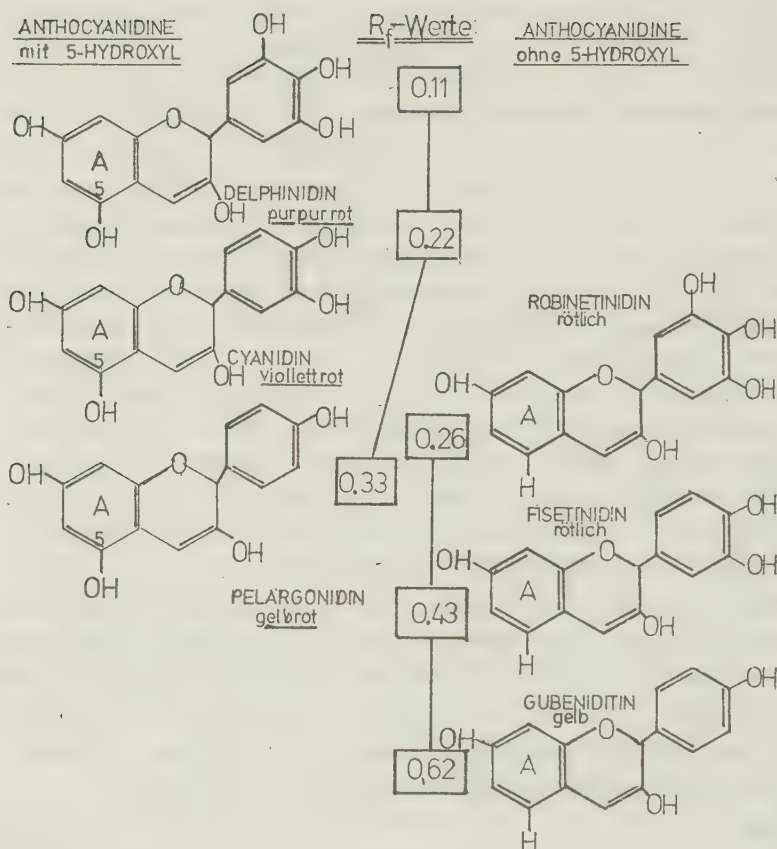
Die Hydrolyse aller untersuchter Pelargoniumarten zeigte nach Trennung über Papierchromatographie im System 90%ige Ameisensäure/3n-HCl (1:1) im UV-366 nm zwei rotviolett fluoreszierende Zonen vom $R_f = 0.22$ und 0.44 .

Die intensiver fluoreszierende Zone ($R_f = 0.22$) hatte gleiche Lauf- und Fluoreszenzeigenschaften mit authentischem CYANIDIN¹⁰¹⁾.

Das UV-Spektrum der eluierten Bande zeigte das charakteristische Maximum bei 545 nm.

Die zweite violettrot gefärbte Zone ($R_f = 0.44$) lag in erheblich niedriger Konzentration vor und lieferte kein aussagekräftiges UV-Spektrum. Wir versuchten daher mögliche Strukturen aus chromatographischen Gesetzmäßigkeiten abzuleiten.

Aus dem Schema 9, S. 80, werden die Gesetzmäßigkeiten der Farbgebung und die Wanderungsgeschwindigkeit der Anthocyanidine deutlich.

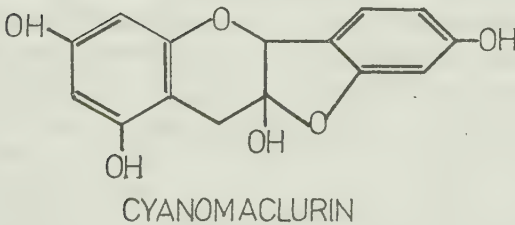
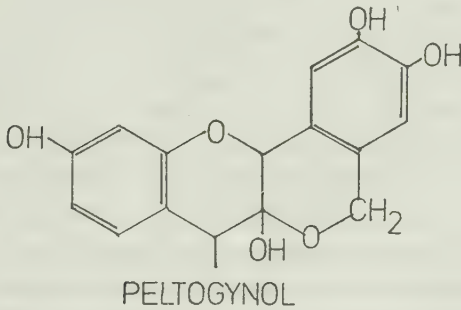


Schema 9

Eine große Zahl an Hydroxylgruppen bedingt eine intensiv rote Farbe und einen niedrigen R_F -Wert. Die Abnahme um je eine Hydroxylgruppe zeigt bei Delphinidin, Cyanidin und Pelargonidin einen R_F -Unterschied von jeweils 0.11, verbunden mit einer Schwächung der Farbintensität.

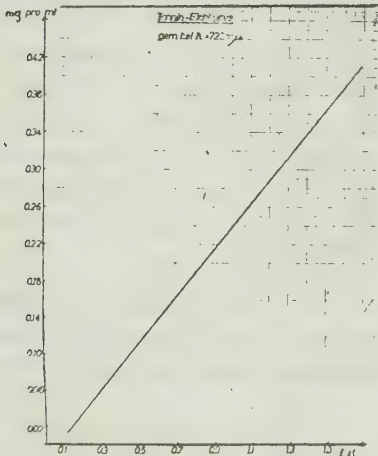
Das unbekannte Anthocyanidin lag mit einem R_F von 0.44 etwa auf der Höhe von Fisetinidin (4 Hydroxylgruppen) und hatte eine dem Cyanidin (5 Hydroxylgruppen) ähnliche Farbe.

Möglicherweise liegt ein Anthocyanidin vom Bindungstyp des Cyanomacclurins oder des Peltogynols vor.



c) Gehaltsbestimmung der Tannine

Die Bestimmung erfolgte nach einer spektroskopischen Methode von GSTIRNER³⁰⁾. Die Gerbstoffe des wässrigen Extraktes werden mit Zinkacetatlösung nach MALVEZIN gefällt, in Schwefelsäure gelöst und mit Phosphorwolframreagenz nach FOLIN umgesetzt. Die gebildete tiefblaue Farbe wird im Zeiss-Spektralphotometer bei 726 nm gemessen. Die Berechnung des Gehaltes ergibt sich aus einer aufgestellten Eichgerade und betrug für *Pelargonium reniforme* 9.3%.



d) Untersuchungen der kondensierten Tannine

Katechine und Leucoanthocyanidine zählen nicht zu echten Tanninen, doch werden dimere Produkte auf Grund ihres Verhaltens allgemein noch zu den Tanninen gerechnet.

Da Tannine durch Behandlung mit wässrigen Mineralsäuren aus Leucoanthocyanidinen gebildet werden, sollten umgekehrt kondensierte Tannine in einen Teil der ursprünglich vorliegenden LA und die daran geknüpften Katechine gespalten werden.

Ausführliche Studien von BETTS, BROWN und SHAW¹⁰²⁾ und BETTS, BROWN und PIKE¹⁰³⁾ über Spaltungen mit conc.HCl ergaben Cyanidin-HCl neben Phloroglucin und Protokatechusäuren. Interessant erscheint jedoch die Methode einer Aufspaltung durch Thioglykollsäure ($\text{HS-CH}_2\text{-COOH}$). Nach LINDGREN¹⁰⁴⁾ werden durch die Säure benzoylische C-4-Äther in S-Benzylthioglykollsäuren gespalten. Dabei wird das Tannin zum Monomeren abgebaut.

Nach dem Reaktionsverhalten des Katechins war auch in unserem Fall eine Verknüpfung monomerer Bestandteile vom C-4 ausgehend anzunehmen.

Papierchromatographisch konnten wir als Spaltprodukte (+)-Katechin, in geringer Konzentration (-)-Epikatechin und Cyanidin nachweisen.

11. Isolierung und Identifizierung biogener Amine und Aminosäuren

Als "biogene Amine" wurden die in der Natur weit verbreiteten Amine definiert, die im Verlaufe von Stoffwechselreaktionen z.B. fermentative Decarboxylierung von Aminosäuren, entstehen. Sie werden als niedermolekulare, aliphatische, fettaromatische oder heterocyclische organische Basen mit den Alkaloiden in Verbindung gebracht und als "Proto- bzw. Pseudoalkaloide" bezeichnet.

Die Anwendung von Pelargonium-Wurzeln in der südafrikanischen Volksmedizin bei verschiedenartigen Blutungen ließ eine Prüfung auf Histamin oder ähnlich wirkende Amine angebracht erscheinen.

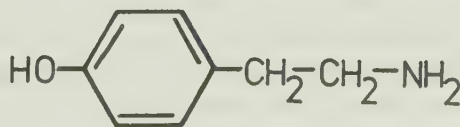
Histamin¹⁰⁵⁾, das durch Decarboxylierung aus der Aminosäure Histidin im Organismus selbst oder durch Bakterien im Darm gebildet wird, bewirkt eine direkte Erregung der glatten Muskulatur, z.B. der Darm- und Uterusmuskulatur.

Für Tyramin¹⁰⁶⁾ wurde die Noradrenalin-freisetzende Wirkung nachgewiesen. Man zählt das Amin zu den "indirekten Sympathomimetika".

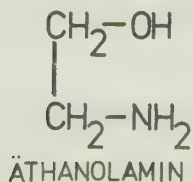
Über das Vorliegen biogener Amine in Geraniaceen finden sich wenige Angaben. So konnte van EIJK¹⁰⁷⁾ in einer Erodium-Art Cholin, Histamin und möglicherweise Coffein nachweisen. Von WERLE und RAUB¹⁰⁸⁾ wurde in Reihenuntersuchungen bei verschiedenen Pflanzenfamilien die Abwesenheit von Histamin in den Geraniaceae festgestellt.

Biogene Amine können im Gegensatz zu den höhermolekularen Alkaloiden als freie Basen nicht mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt werden. Sie sind meist wasserlösliche Verbindungen, die mit den in pflanzlichen Geweben auftretenden Säuren leichtlösliche Salz bilden.

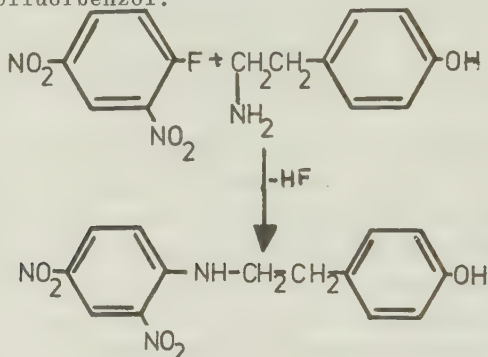
Zur Gewinnung der Aminfraktion wurde ein wässriger Drogenextrakt stark eingengt und über eine Ionenaustauscher-Dowex-Säule gegeben. Nach Auswaschen der Aminosäuren mit Wasser wurde die Aminfraktion durch Elution mit 4.5 molarer NH_4OH erhalten.



TYRAMIN
β-OXYPHENYLÄTHYLAMIN



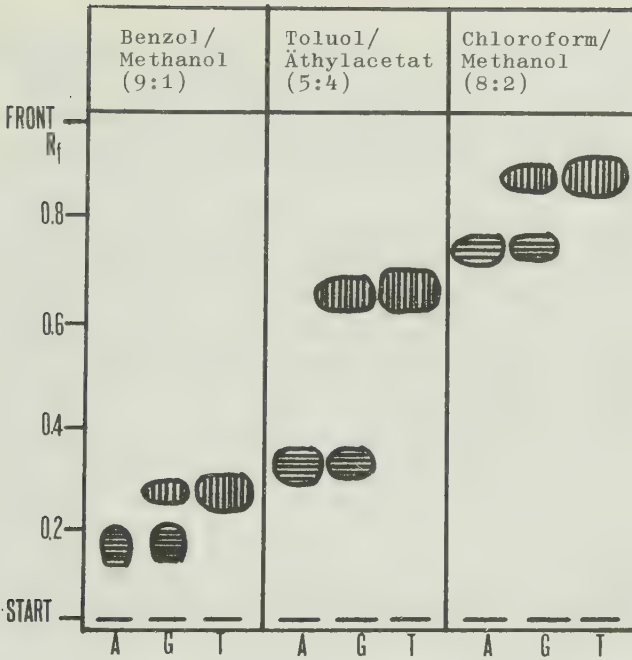
Die Charakterisierung der chromatographisch nachweisbaren Amine Tyramin und Äthanolamin erfolgte durch Umsetzung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol.



Die in organischen Systemen löslichen, gelb gefärbten, N-substituierten 2,4-Dinitranilinderivate sind gut kristallisierbar. Die Auftrennung des Gemisches erfolgte über Kieselgelplatten. Die in der Literatur angegebenen Laufmittelsysteme^{109,110)} z.B. Pentan/Benzol/Triäthylamin führten selbst nach mehrmaligem Entwickeln zu keiner Wanderung im Chromatogramm. Versuche mit Mischungen aus Benzol/Methanol, Chloroform/Methanol und Toluol/Äthylacetat brachten eine klare Auftrennung in zwei Zonen.

Wie aus folgender Abbildung ersichtlich, zeigen die beiden Substanzflecke Identität mit authentischen DNP-Tyramin und DNP-Äthanolamin. (Abb. 22, S. 85).

Die über Kieselgelplatten im System Toluol/Äthylacetat (5:4) getrennte Zone des DNP-Tyramins wies nach dem Umkristallisieren aus Methanol/Aceton einen scharfen Schmelzpunkt von 168°C auf. Die Literaturangaben schwanken zwischen 156¹¹¹⁾ bis 165°C¹¹²⁾.



A = DNP-Äthanolamin T = DNP-Tyramin G = Testgemisch

Abb. 22



Abb. 23

UV-Spektrum des DNP-Tyramins

Äthanolamin konnte aus der ursprünglich vorliegenden Aminfraktion als azetropes Gemisch mit Toluol destilliert werden. Da das Amin in Pelargonium reniforme nur in einer Konzentration von $0.95 \mu\text{g}/1 \text{ g}$ Droge vorlag, konnte die optische Drehung nicht bestimmt werden.

Die Gehaltsbestimmung von Äthanolamin und Tyramin wurde durch Vergleich mit Aminlösungen bekannter Konzentration dünnschichtchromatographisch auf Zelluloseplatten nach Detektion mit Ninhydrin-Reagenz durchgeführt. Die Konzentration von Tyramin lag bei $400 \mu\text{g}/1 \text{ g}$ Droge. Vergleichswerte von biogenen Aminen, die in Früchten und Gemüse nachgewiesen und mit der gleichen Methode bestimmt wurden, bewegen sich in den folgenden Bereichen:

Tyramin: $20 - 95 \mu\text{g}/1 \text{ ml}$ Sauerkrautsaft¹¹³⁾

$10 \mu\text{g}/1 \text{ g}$ Orangen¹¹⁴⁾

$13 - 93 \mu\text{g}/1 \text{ g}$ Himbeeren¹¹⁴⁾

Von den beiden Aminen ließ sich Äthanolamin mit dem üblichen Aminosäureanalyser erfassen. Der entsprechende Peak war von dem NH_3 -Peak überlagert (s. Abb. 24, S. 87).

Durch den Aminosäureanalyser wurden im unhydrolysierten Pelargonium reniforme Extrakt die nachstehend aufgeführten Aminosäuren ermittelt:

1 = Lysin

7 = Glutaminsäure

2 = Histidin

8 = Prolin

3 = Arginin

9 = Alanin

4 = Cysteinsäure

10 = Valin

5 = Asparagin

11 = Leucin, Isoleucin

6 = Threonin

12 = Phenylalanin

Nach der Hydrolyse des Pelargonium-Extraktes waren erwartungsgemäß weitere Aminosäuren nachzuweisen (s. Abb. 24, S. 87).

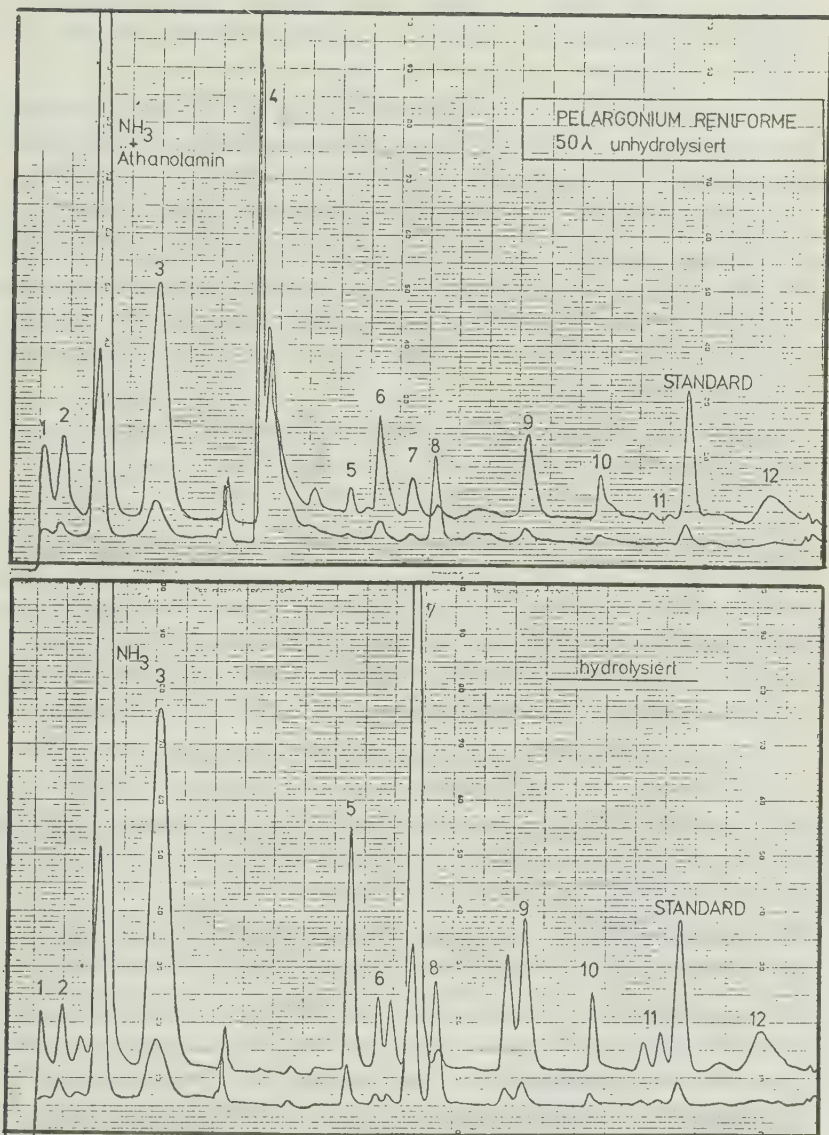


Abb. 24

12. Isolierung und Identifizierung der Sterine in Pelargonium- wurzeln

Über Lipidverbindungen in Pelargonium-Arten fanden sich nur bei ESTERNER u. LISHERN¹¹⁵⁾ und AEXEL, RAMSEY u. NICHOLAS¹⁵⁾ einige Angaben. In der getrockneten blühenden Gesamtpflanze von Pelargonium hortorum wurden Sitosterin (79%), Stigmasterin (6%), Cholesterin (4%) und Campesterin (12%) aufgefunden.

Bei den untersuchten südafrikanischen Pelargonium-Arten gaben sowohl der Petrolätherextrakt, als auch der unverseifbare Anteil des methanolischen Extraktes eine positive LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion.

Dünnschichtchromatographisch wurde bei allen Pelargonium-Arten nach Besprühen mit Phosphormolybdänsäure im R_f -Bereich des β -Sitosterins ein Sterin lokalisiert.

Der eingeengte Petrolätherextrakt lieferte nach Aufnahme in Aceton und Zugabe von wenig Wasser feine weiße Kristallnadeln. Der Mischschmelzpunkt mit β -Sitosterin ergab eine Depression. Das Sterin-Acetat lieferte nach dem Umkristallisieren aus Äthanol/Petroläther farblose Plättchen vom Schmelzpunkt 173 - 175°C, wogegen β -Sitosterinacetat bei 128 - 129°C schmolz.

Im NMR-Spektrum tritt eine tertiäre Methylresonanz bei $\delta = 0.55$ ppm und 0.79 ppm, sekundäre Methylresonanz bei $\delta = 1.02$ ppm, Methylprotonenresonanz im Bereich $\delta = 0.8$ ppm bis 2.5 ppm, ein Multiplett bei $\delta = 3.3$ ppm bis 4.5 ppm und das Multiplett zweier Vinylprotonen bei 5.13 ppm auf.

Das NMR-Spektrum des Acetates war dem ursprünglichen Sterin mit Ausnahme des zusätzlichen Acetylsignals sehr ähnlich.

Das Massenspektrum zeigte durch das Auftreten zweier Massenpeaks M^+ 456 und M^+ 454 ein Gemisch an. Die beiden Massen sind den Molekulargewichten der Acetate von β -Sitosterin ($C_{31}H_{52}O_2$) und Stigmasterin ($C_{31}H_{50}O_2$) zuzuordnen.

Die zum Beweis durchgeführte Hydrierung des Gemisches nach BERNSTEIN und WALLIS¹¹⁶⁾ ergab aus Äthanol/Petroläther 1:1 farblose Plättchen, die mit authentischem β -Sitosterinacetat keine Schmelzpunktsdepression mehr aufwiesen.

Das Massenspektrum des nunmehr hydrierten Produktes zeigte nur noch den Massenpeak von 456 und stimmte in der Fragmentierung mit den Angaben von FITSCHES¹¹⁷⁾ überein.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß im Petrolätherextrakt der Pelargonium-Art eine Mischung von β -Sitosterin und Stigmasterin vorliegt, während im unverseifbaren Anteil des methanolischen Auszuges nur β -Sitosterin nachweisbar war.

Die aus heißem Aceton umkristallisierte Substanz zeigte einen scharfen Schmelzpunkt bei 136°C und ein mit authentischem β -Sitosterin identisches IR-Spektrum.

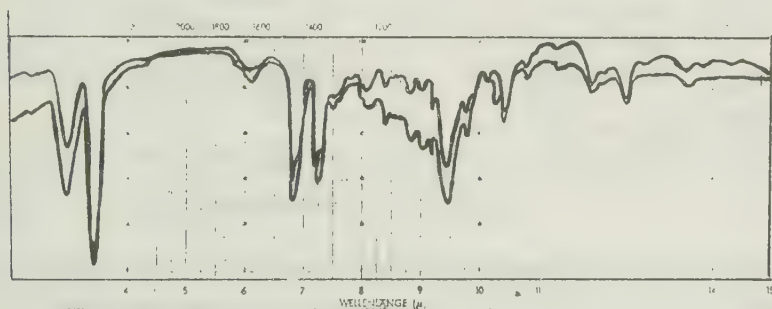


Abb. 25

Überlagerungsaufnahme

13. Untersuchung auf weitere Lipide einschließlich der Fettsäuren

Eine im UV-366 nm grün fluoreszierende Zone, die auf Kieselgel in lipophilen Laufmitteln im oberen R_F -Bereich lag, war Kohlenwasserstoffen, Sterinestern und Triglyceriden zuzuordnen.

Die Hauptmenge des Gemisches fand sich im Petrolätherauszug. Nach Abtrennung der bekannten Sterine wurden nach Detektion mit Rhodamin 6 G¹¹⁸⁾ neben einer blauen Zone sechs gelb fluoreszierende Zonen im langwelligen UV-Licht nachgewiesen. Sie konnten durch Vergleich mit Lipiden von Algenextrakten bekannter Zusammensetzung identifiziert werden (Abb. 26, S. 90).

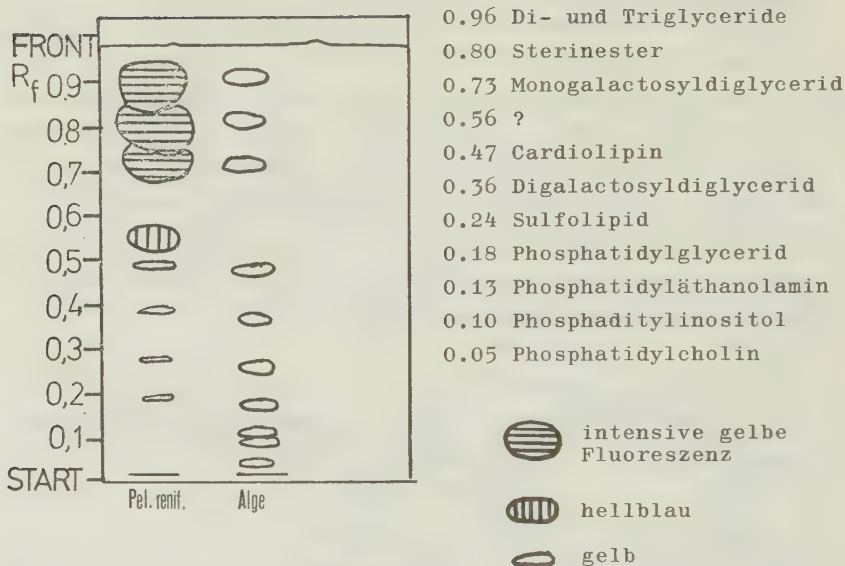
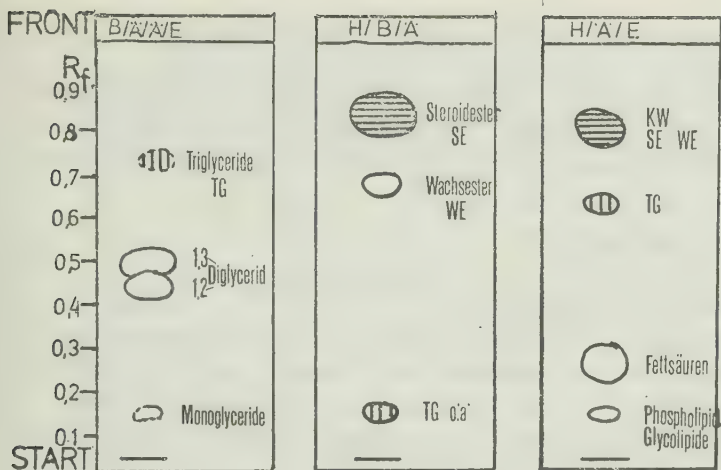


Abb. 26

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Aceton/Benzol/Wasser (91:30:8) nach Detektion mit Rhodamin 6 G im UV-366 nm

Neben Cardiolipin waren Spuren Digalactosyldiglycerid, Sulfolipid und Phosphatidylglycerid nachweisbar, Verbindungen, die sonst typisch sind für assimilierende Pflanzenteile.

Die weitere Auftrennung des R_f-Bereiches 0.7 - 0.95`ergab hauptsächlich Steroidester, 1,3- und 1,2-Diglyceride neben wenig Triglyceriden und Spuren von Phospholipiden und Glycolipiden (Schema 9, S. 91).



Schema 9

B/Ä/Ä/E = Benzol/Äthylacetat/Äther/Eisessig (80:10:10:0.3)¹¹⁹⁾
H/Ä/E = Hexan/Äther/Eisessig (90:25:2)
H/B/Ä = Hexan/Benzol/Äther (80:20:2)

Die Gaschromatographie der Fettsäuremethylester auf EGSS-X (Äthylenglykolsuccinat-Polyester) lieferte die in Tabelle 8 angegebene Zusammensetzung.

T a b e l l e 8

Säuren	Prozentgehalt
12:0 Laurinsäure	<1.0%
14:0 Myristinsäure	1.8%
16:0 Palmitinsäure	36.9%
16:1 ?	<1.0%
16:2	
18:0 Stearinsäure	4.2%
18:1 Ölsäure	29.2%
18:2 Linolsäure	21.6%
18:3 Linolensäure	<1.0%
20:0 Arachinsäure	2.5%

D. Pharmakologische und bakteriologische Untersuchungen

Inwieweit die von der Umcka-Droge berichteten Wirkungen gegen Tuberkulose auf die in der Pflanze nachgewiesenen Inhaltsstoffe bezogen werden können, sollen die nachfolgenden Untersuchungen zeigen.

I. Bisherige Kenntnisse

Das Phenolderivat Kaffeensäure^{120,121,122,123)} und das Flavon Quercetin^{124,125)} haben nachweislich antibakterielle Wirksamkeit, die am stärksten bei einem pH unter 7.0 zur Entfaltung kommt und an der unteren Grenze von Substanzen liegt, die als Antibiotika bezeichnet werden (1.44 mg Kaffeensäure entsprechen 1 OE Penicillin¹²⁶⁾).

Bei beiden Substanzen wurde Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien, wie z.B. Streptomyces aureus und Mycobacterium tuberculosis¹²⁷⁾ festgestellt.

Die bakterizide Wirkung des Weines soll nach CARLES u. PECH¹²⁸⁾ und MASQUELIER¹²⁹⁾ auf seinem Anthocyan- und Anthocyanidgehalt beruhen. Möglicherweise ist dieser Effekt auch den Leukoanthocynidinen zuzuschreiben. Anthocyanhaltige Pflanzen sind nach MANDRIK¹³⁰⁾ widerstandsfähiger gegen Pilz- und Mikrobenbefall.

Protokatechusäure, Gallussäure und p-Cumarsäure zeigen bei Pisum sativum nach KURODA¹³¹⁾ eine Schutzwirkung gegen Mikrobenbefall. Bei der Lungentuberkulose der Maus wird die antibakterielle Wirkung von Streptomycin-Gaben durch d-Katechin verstärkt, dagegen gehemmt bei Streptokokken¹³²⁾).

Cumarinderivate sind nach BOSE¹³⁹⁾ sehr unterschiedlich in ihrer antibakteriellen Wirkung. Ausführlich beschäftigten sich GREBUS et al¹³⁴⁾ mit Aesculetin, Aesculetinglykosiden und Daphnetin. Eine Wachstumshemmung zeigte jedoch nur Daphnetin in einer Konzentration von 200 ppm gegen Staphylococcus aureus und Escherichia coli. Nach FUJIKAWA¹³⁵⁾ wirkt es auch gegen Micrococcus pyrogenes und bereits in einer Konzentration von 100 ppm gegen S.aureus und E.coli.

Nach SENIG¹³⁶⁾ besitzt Aesculetin eine Wachstums hemmung bei *Sporocytophaga myxococcoides* und *Polyangium cellulosum*, nach OZERESKOVSKAYA¹³⁷⁾ Scopoletin bei *Fusarium solani*. Der Einfluß auf *Saccharomyces cerevisiae* und anderer Hefen wurde von DADAK¹³⁸⁾ untersucht. LEDERBERG¹³⁹⁾ stellte mit der "replica plating procedure"-Methode eine starke antibakterielle Wirkung einfacher Cumarine gegen grampositive und gramnegative Bakterien fest.

Eigene Arbeiten

1. Toxizitätsprüfung

Durch Versuche im Laboratorium konnte gezeigt werden, daß Umcka-Auszüge auch bei relativ hoher Dosierung keine Toxizitätserscheinungen auslösen. (Tabelle 9, S.94).

Diese Angaben stehen in Einklang mit Versuchen, die mit konzentrierten Umckaloabo-Extrakten an Ratten in England durchgeführt worden sind.

Auszugsweise wird aus dem Versuchsprotokoll folgende Tabelle (Tabelle 10, S.94) wiedergegeben.

Die Versuchsreihe ergab, daß keines der Tiere, die mit 10 und 20 ml/kg Umckaloabo-Extrakt gefüttert wurden, irgendwelche Anzeichen einer Krankheit zeigten.

Bei 30 ml/kg wurde eine Abnahme der Aktivität und Schwindelercheinungen beobachtet. Bei 40 ml/kg kollabierten die Tiere nach dem Auftreten von Schwindelanfällen innerhalb von 10 bis 15 Minuten, erholten sich jedoch aus ihrer Bewußtlosigkeit nach 2 bis 4 Stdn. Erst Gaben von 45 bis 50 ml/kg führten bei einigen Tieren zum Exitus, andere erholten sich wieder innerhalb von 12 bis 14 Stdn.

Die LD₅₀ für den Umckaloabo-Extrakt betrug demnach 48.5 ml/kg Körpergewicht.

T a b e l l e 9

Präparat	Dos. cc/kg	Tiergew. in g	Appl. cc per os	Wirkungsbild
Umckaloabo	20	170	3.4	normales Verhalten den ganzen
Extrakt wässr.	20	168	3.35	Versuchstag hindurch (8 Stdn.
2.5 g Droge/ 100cc	20	200	4.0	
	30	100	3.0	normales Verhalten den ganzen
	30	180	5.4	Versuchstag hindurch (8 Stdn.
	30	195	5.8	
	40	180	7.2	leicht apat. aber gut geräuscho
	40	125	5.0	empfindlich ca. 1 Std., an-
	40	130	5.2	schließend normales Verhalten
	50	100	5.0	leicht apat. ebenfalls gut ge
	50	210	10.5	räuschempfindlich ca. 1 Std.,
	50	170	8.5	anschließend normales Verhal-
				ten
Umckaloabo	50	200	10.0	nach Einspritzung leicht apat
Suspension	50	200	10.0	leicht geräuschempfindlich
10 g Droge/ 50cc A.dest.	50	100	5.0	ca. 20 Minuten, dann abflauen
				leicht beschleunigte Atmung,
				nach 1 1/3 Std. wieder norma-
				les Verhalten
Methan.	50	195	9.7	ganz leicht apat. nach 30 Mi-
Extrakt von	50	195	9.7	nuten, l. beschleunigte Atmun
Umckaloabo	50	225	11.2	l. schmerzunempfindlich nach
20 g Droge/ 100cc A.dest.				40 Minuten, aber nur vorüber-
				gehend, nach 1 1/2 Std. wieder
				schmerz- und geräuschempfind-
				lich = normales Verhalten

T a b e l l e 10

Dose-Mortality of Umckaloabo Concentrate

Extract when fed to Rats

Dose in cc/kg of body weight	No. of Animals Surviving dose	No. Animals Succumbing dose	% Mortality	Equivalent huma dose in cc/70 K
10	5	0	0	700
20	5	0	0	1400
30	5	0	0	2100
40	5	0	0	2800
45	4	1	20	3150
50	2	3	60	3500

2. Bakteriologische Untersuchungen

Zur bakteriologischen Untersuchung wurden Testreihen im staatlich bakteriologischen Untersuchungslaboratorium in München (Direktor Dr.med.Bl.Freytag) durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe kamen 4 Substanzgemische zur Anwendung, die den in Schema 1, S.27, aufgeführten Fraktionen 1, 2, 3 und 4 entsprechen. Sie wurden auf ihre bakteriostatische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus haemolyticus*, *Streptococcus haemolyticus*, *B.cereus*, *Escherichia coli* und *Mycobacterium tuberculosis* geprüft.

Die Ergebnisse des Lochtestes und des Röhrchenverdünnungstestes gehen aus Tabelle 11 und Tabelle 12 hervor.

T a b e l l e 11

Ergebnis des Lochtestes

Fraktionen	Hemmhof der Prüfbakterien (in mm des Durchmessers)			
	Staphyl. aureus haemol.	Strepto- coccus haemol.	Escherichia coli	B.cereus
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	4	4	0	0
4	0	0	0	0
Kontrolle ohne Zusatz	0	0	0	0

T a b e l l e 12
Ergebnis des Röhrchenverdünnungstestes

Prüfsubstanz	Prüfbakterien	Substanzverdünnungen			
		1:10	1:20	1:40	1:80
1 Aglykone	a) Staphylococcus aureus haemolyticus	+	+	+	+
	b) Streptococcus haemolyticus	+	+	+	+
	c) Escherichia coli	+	+	+	+
	d) B.cereus	+	+	+	+
2 Glykosid- und Säuregemisch	a) Staphylococcus aureus haemolyticus	-	-	-	-
	b) Streptococcus haemolyticus	-	-	-	-
	c) Escherichia coli	+	+	+	+
	d) B.cereus	-	-	-	-
3 Säuregemisch Diglykoside	a) Staphylococcus aureus haemolyticus	-	-	-	-
	b) Streptococcus haemolyticus	-	+	+	+
	c) Escherichia coli	+	+	+	+
	d) B.cereus	+	+	+	+
4	a) Staphylococcus aureus haemolyticus	+	+	+	+
	b) Streptococcus haemolyticus	+	+	+	+
	c) Escherichia coli	+	+	+	+
	d) B.cereus	+	+	+	+
Kontrolle ohne Testsubstanz	Gutes Wachstum aller Bakterienarten in der Nährbouillon ohne Prüfsubstanzbeigaben				

- : kein Bakterienwachstum

+ : Bakterienwachstum

Die Beeinflussung des Wachstums von Tuberkelbazillen des Typus humanus und des Typus bovinus wurde auf festen Nährböden nach PETRAGNANI u. KIRCHNER¹⁴⁰⁾ geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 niedergelegt.

T a b e l l e 13
Ergebnis der Prüfung auf Tuberkelbakterien

Prüfsubstanz -Gemisch-	Tuberkelprüf- bakterien	Substanzverdünnung u. Nährbodenart					
		A = PETRAGNANI			B = KIRCHNER		
		1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
1 (1 + 2 + 3)	a) Typ humanus	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	b) Typ bovinus	+	++++	++++	++++	++++	++++
2 (4 + 5 + 6)	a) Typ humanus	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	b) Typ bovinus	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3 (6+7+8)	a) Typ humanus	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	b) Typ bovinus	++++	++++	++++	++++	++++	++++
4 (9+10)	a) Typ humanus	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	b) Typ bovinus	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Kontrolle ohne Zusatz	a) Typ humanus		++++			++++	
	b) Typ bovinus		++++			++++	

+ bis ++++ = Intensität des Bakterienwachstums

Alle angelegten Tuberkelbakterienkulturen wurden in wöchentlichen Abständen nach der Beimpfung durchgesehen. Gegenüber den Kontrollen war die Intensität des Wachstums auf den mit verschiedenen Verdünnungen der Prüfsubstanzen versehenen Nährböden nur in einem Röhrchen herabgesetzt. Das Substanzgemisch 1, das aus Lipoiden, den Cumarinen Umckalin, Umckalinmonomethyläther, Scopoletin und den beiden Flavonen besteht, zeigt diese Wirkung, während die anderen Fraktionen fast den Eindruck vermitteln, daß die Kulturen mit den Lösungsmittelverdünnungen 1:1000 sogar eine Begünstigung des Tuberkelbakterienwachstums erfuhren.

Das Gesamtergebnis dieser Versuche besagt, daß unter den aufgezeigten Untersuchungsbedingungen die Substanzen 4 bis 8 eine Bakteriostase gegenüber grampositiven Kokken aufweisen. Die Substanzen 4 + 5, 6, 6a) besitzen auch gegenüber den grampositiven, sporenbildenden Bazillus cereus eine wachstumshemmende Wirkung. Sonstige bakteriostatischen Wirkungen der Prüfsubstanzen auf das Bakterienwachstum waren nicht mit Sicherheit zu beobachten.

In der zweiten Versuchsreihe kamen in erster Linie angereicherte Fraktionen des methanolischen Extraktes zur Anwendung. Die Zusammensetzung der Substanzgemische ergibt sich wie folgt:

Gemisch 1	Sterinester, Triglyceride
G 2	Aglykone (Cumarine, Flavonoide)
G 3	
G 4	Glykoside, Hydroxyzimtsäurederivate (Umckalosid, Scopolin)
G 5	Diglykoside (?)
G 6	Gemisch unidentifiziert, Gerbstoffe
G 7	

Die Prüfung der Beeinflussung des Bakterienwachstums von Staphylococcus aureus haemolyticus, haemolyt. Streptokokken, Colibakterien und B. cereus, erfolgte gleichzeitig im Loch- und Röhrchenverdünnungstest.

Im Lochtest wurde gegenüber den aufgeführten Bakterien keine Beeinflussung im Wachstum beobachtet. Alle 7 Substanzgemische zeigten das gleiche Verhalten.

Durch Substanzgemisch 1, 2 und 5 konnte bei einer Verdünnungsreihe von 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 das Wachstum haemolytischer Streptokokken nicht beeinflusst werden.

Die Gemische 3, 4, 6 und 7 zeigen dagegen in einer Verdünnung von 1:10 und zum Teil auch in der Verdünnung 1:20 eine Hemmung des Streptokokkenwachstums. G 3 hemmt das Wachstum in der Verdünnung 1:10 vollständig. Bei 1:20 war keinerlei Wirkung mehr feststellbar. G 4 hemmt in 1:10 und in 1:20-Verdünnung vollständig, jedoch nicht mehr in der 1:40-Verdünnung. G 6 hemmt in 1:10 und 1:20 nur unvollständig das Wachstum. In 1:40-Verdünnung war keine Beeinflussung mehr feststellbar. G 7 verhält sich entsprechend dem Gemisch G 6.

Das Wachstum der anderen Bakterien wurde von keinem der 7 Substanzgemische beeinflusst.

Die Prüfung der Beeinflussung des Wachstums der Tuberkelbazillen (Typ humanus und bovinus) ergab bei allen 7 Substanzgemischen ein negatives Ergebnis. Es konnte keine bakterienhemmende Wirkung festgestellt werden.

In einer dritten Versuchsreihe wurden die Cumarinderivate Aesculetin, Scopoletin, Umbelliferon, Herniarin und Methylumbelliferon, die strukturelle Verwandtschaft mit Umckalin zeigten, im Lochtest, Röhrchenverdünnungstest und auf flüssigen Nährböden nach KIRCHNER, untersucht.

In Verdünnungsreihen wurden nicht nur die Testsubstanzlösungen, sondern auch Alkohol, der in allen Fällen zur Lösung erforderlich war, auf bakterizide Wirkung geprüft.

Im Lochtestverfahren auf Frischblutagarplatten konnte kein Einfluß auf schnellwachsende Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken, Colibakterien und B.cereus) beobachtet werden.

Im Röhrchenverdünnungstest zeigten Aesculetin, Umbelliferon und Methylumbelliferon eine einwandfrei nachweisbare Wirkung auf Staphylococcus aureus haemolyticus. Weniger ausgeprägt zeigte sie sich bei Herniarin.

Zur Austitrierung wurde eine Verdünnungsreihe bis 1:2560 angesetzt und neben dem grampositiven *S.aureus* haem. auch das gramnegative *B.coli* (*Escherichia coli*) gegenüber Substanz 1, 3 und 5 getestet. Aesculetin und Herniarin übten nicht nur auf *S.aureus* haem., sondern auch auf *Escherichia coli* eine wachstumshemmende Wirkung aus, die bei 1:20 bzw. 1:40 festzustellen war.

Die Ergebnisse der drei Versuchsreihen sind in den folgenden Tabellen 14, 15 und 16 aufgeführt.

T a b e l l e 14
Ergebnis des Lochtestes

Prüfsubstanz	Hemmhof des Bakterienwachstums			
	<i>Staphyl.aureus</i> haemolyticus	<i>Streptococcus</i> haemolyticus	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>B.cereus</i>
1 = Aesculetin	0	0	0	0
2 = Scopoletin	0	0	0	0
3 = Umbelliferon	0	0	0	0
4 = Herniarin	0	0	0	0
5 = Methylumbelliferon	0	0	0	0
70%iger Äthylalkohol	0	0	0	0

T a b e l l e 15
Ergebnisse des Röhrchenverdünnungstestes

Prüfsubstanz	Prüfstämme	Verdünnungsreihe			
		1:10	1:20	1:40	1:80
Aesculetin	Staphylococcus aureus haemolyticus	-	-	-	-
Herniarin	Staphylococcus aureus haemolyticus	-	-	+	+
Umbelliferon	Staphylococcus aureus haemolyticus	-	-	-	-
α-Methyl-Umbelliferon	Staphylococcus aureus haemolyticus	-	-	-	-
70% C ₂ H ₅ OH	Staphylococcus aureus haemolyticus	-	+	+	+

+ = Bakterienwachstum

- = kein Bakterienwachstum

T a b e l l e 16

Prüfsubstanz	Prüfstämme	Verdünnungsreihe							
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
Aesculetin	Staph.aure.h.	-	-	-	-	-	-	+	+
	B.coli	-	-	+	+	+	+	+	+
Herniarin	Staph.aur.h.	-	-	+	+	+	+	+	+
	B.coli	-	+	+	+	+	+	+	+
Methylumbelliferon	Staph.aur.h.	-	-	-	-	+	+	+	+
	Staph.aur.h.	+	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+	+	+	+
70% C ₂ H ₅ OH	B.coli	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = Bakterienwachstum

- = kein Bakterienwachstum

1) das Bakterienwachstum in diesen Kontrollröhrchen war schwach

Zur Prüfung der Hemmwirkung der angeführten Testsubstanzen auf zwei Tuberkelbakterienstämme, ein Typ humanus und ein Typ bovinus in flüssigen Nährböden nach KIRCHNER (mit Serumzusatz) konnten nur negative Aussagen gemacht werden. Es zeigte sich keine Herabsetzung des Tuberkelbakterienwachstums gegenüber den Kontrollen mit und ohne Zugabe von Äthanol.

T a b e l l e 17

Prüfsubstanz	Tbc-Prüfstamm	Ergebnis des Bakterienwachstums
Substanz 1	Typ humanus	+
(noch etwas Bodensatz)	Typ bovinus	+
Substanz 2 (nur noch	Typ humanus	+
Spuren der Substanz)	Typ bovinus	+
Substanz 3	Typ humanus	+
	Typ bovinus	+
Substanz 4	Typ humanus	+
	Typ bovinus	+
Substanz 5	Typ humanus	+
	Typ bovinus	+
70% Äthylalkohol	Typ humanus	+
1.Kontrolle	Typ bovinus	+
70% Äthylalkohol	Typ humanus	+
2.Kontrolle	Typ bovinus	+
70% Äthylalkohol	Typ humanus	+
3.Kontrolle	Typ bovinus	+
Nährbodenkontrolle	Typ humanus	+
	Typ bovinus	+
Nährbodenkontrolle	Typ humanus	+
	Typ bovinus	+
Nährbodenkontrolle	Typ humanus	+
	Typ bovinus	+

+ = Bakterienwachstum

Diskussion der bakteriologischen und pharmakologischen Untersuchungen

Die durchgeführten Untersuchungen lassen erkennen, daß bei den getesteten Reinsubstanzen bzw. bei Umcka-Fractionen eine bakterio-statische Wirkung gegenüber einer Reihe von Bakterienstämmen besteht. Während die Umcka-Fractionen nicht in allen Fällen wirksam sind, besitzen die verwendeten Reinsubstanzen, die mit Umckalin strukturell verwandt sind, eine beträchtliche Hemmwirkung, die besonders gegenüber Staphylokokken deutlich in Erscheinung tritt.

Eine nachweisbare Wirkung gegenüber verschiedenen TBC-Stämmen war allerdings in der angewandten Konzentration nicht feststellbar. Dieser Befund deckt sich insofern mit Arbeiten von BERSCH und DÖPP¹⁴¹⁾, die bei Umbelliferon und anderen Cumarinen nur eine minimale tuberkulostatische Wirkung finden konnten, während die genannten Verbindungen beispielsweise gegenüber Staphylokokken^{142,143)} und den Erregern der Brucellose^{144,145)} eine deutliche Hemmwirkung entfalten.

Da bei den chemischen Untersuchungen festgestellt wurde, daß neben Cumarinen auch die analogen Zimtsäurederivate vorliegen, ist den Säuren ein Teil der bakterio-statischen Wirkung zuzuschreiben.

Die anderen in der Umckaloabo-Droge gefundenen Stoffe, wie der hohe Gehalt an Oxalat, Kieselsäure und Gerbstoff, dürften an einer pharmakologischen Wirkung der Droge beteiligt sein. Gerbstoff entfaltet bei entzündlichen Prozessen, katarrhalischen Erkrankungen, Diarrhoe u.ä. eine günstige Wirkung.

So wurden die bekannten Gerbstoffdrogen Rhizoma Tormetillae und Rhizoma Polygoni avic. bei Blutungen und sogar bei Darmtuberkulose empfohlen¹⁴⁶⁾.

Auch die Kieselsäure wird bei innerlicher Verwendung in der Volksmeinung seit langem eine günstige Wirkung auf die Lungentuberkulose zugeschrieben. Ihre diesbezüglich pharmakologischen Eigenschaften sind nach Untersuchungen von KOBER¹⁴⁷⁾ an die organisch gebundene Kieselsäure geknüpft. Die tuberkulösen Herde sollen, soweit sie

gutartig sind, leichter vernarben, da die Resistenz des Bindegewebes gegenüber den tuberkulösen Einschmelzprozessen durch die Kieselsäure erhöht wird. Gleichzeitig soll durch die zugeführte Kieselsäure eine verstärkte Leukozytose erreicht werden.

Auf Grund der gefundenen Cumarinderivate, Zimtsäuren, Amine, Sterine, Lipide und Flavonoide ist nicht zu erwarten, daß die *Pelargonium reniforme*-Droge (Umckaloabo) einem bekannten synthetischen Tuberkulostatikum in der Wirkung gleichkommt. Andererseits liefern die Untersuchungen eine genügend gute wissenschaftliche Erklärung für die volksmedizinische Anwendung.

Zusammenfassung

1. Durch mikroskopische, chromatographische, ethnobotanische und medikologische Untersuchungen konnte die Identität der Umckalobo-Droge mit Pelargonium reniforme Curt. festgestellt werden. Geringfügige chromatographische Abweichungen dürften auf Standortunterschiede o.ä. zurückzuführen sein.
2. Die chemische Analyse führte zur Isolierung eines Cumarinderivates (Umckalin), dem auf Grund von spektrophotometrischen Untersuchungen, der Synthese des Monomethyläthers und einer Röntgenstrukturanalyse die Struktur eines 5,6-Dimethoxy-7-hydroxycumarins zugeordnet werden konnte.

Der Monomethyläther des Umckalins wurde auch im methanolischen Umcka-Extrakt nachgewiesen.

Umckalin liegt ferner als 7-0-Glucosid (Umckalosid) vor. Daneben konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß auch ein Diglykosid und die offenkettige Form des Umckalins bzw. des Umckalosids, die Umckalinsäure, vorliegt.

Als zweites Cumarinderivat wurde aus der Droge das Scopoletin und das 7-0-Glucosid, Cichoriin-monomethyläther, nachgewiesen.

3. An weiteren phenolischen Inhaltsstoffen kommen in der Droge vor: die Kaffeensäure, die Chlorogensäure, die Flavone Quercetin und Kämpferol, sowie von "Gerbstoffverbindungen", das Katechin und Epikatechin, das Gallokatechin und Epigallokatechin, neben einem hohen Anteil an polymeren Tanninen (Phlobaphene), das Leukoanthocyanidin, identifiziert als Cyanidin nach der Dehydrierung, ferner die p-Cumarsäure und die Protokatechusäure.
4. Von stickstoffhaltigen Verbindungen wurden isoliert bzw. chromatographisch nachgewiesen: die biogenen Amine Äthanolamin und Tyramin, 12 Aminosäuren darunter Histidin und Glutaminsäure. Im Petrolätherauszug ließen sich Stigmasterin und β -Sitosterin neben Triglyceriden, Sterinestern und Cardiolipin nachweisen.

5. Die durchgeführten Antibiose-Teste zeigen für die Säuren- und Glykosid-Fractionen eine deutliche Hemmwirkung gegenüber Streptokokken, Staphylokokken und B.cereus.

Die nachgewiesenen Inhaltsstoffe geben eine hinreichende wissenschaftliche Erklärung für die volksmedizinische Anwendung der Umcka-Droge als Mittel gegen Diarrhoe, Ruhr und Koliken, bedingt gegen Menstruations- und Leberbeschwerden.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Herkunft der Drogen

Die Droge Umckaloabo wurde uns von der Firma Iso-Werk Regensburg zur Verfügung gestellt.

Die verschiedenen Pelargoniumarten wurden in Südafrika gesammelt (siehe Tabelle 14).

T a b e l l e 14

Pelargonium	Fundort	Aussehen	Wurzel
P.betulinum(L.) L'Herit. ex Ait.	oberhalb Llandudno (Kaphalbinsel)	30-35 cm hoch, dünn, rotbraun, buschartig; 20 cm lang, rotumrandete Blätter	"Pfahlwurzel"
P.capitatum(L.) L'Herit. ex Ait.	südlich Llandudno, (Kaphalbinsel) Sandboden nahe Meer	40 cm hoch, buschartig, behaarte Blätter	hellbraun mit rotbraunem Mantel
P.cucullatum(L.) L'Herit. ex Ait.	Kirstenbosch, Konturpfad (Kaphalbinsel)	hochwüchsig, buschartig	dick, kräftig, rotbraun
P.hirtum (Bastard)	Lionsmountain, (Kapprovinz)	25-30 cm hoch, dünn gesägte Blätt.	hellbraun
P.luridum Sweet	Pietermaritzburg (Natal)	10 cm hoch, kleinwüchsig	rundlich, rotbraun, eingeschnürt
P.moreanum Sweet	Kirstenbosch, Tafel- berg (Kapprovinz)	20 cm hoch, kleinwüchsig	dünn, lang, hell- braun
P.myrrifolium (L.) L'Herit. e.A.	Kirstenbosch (Kapprovinz)	20 cm hoch, kleinwüchsig	rotbraun, dünn, kurz
P.reniforme Curt.	Grahamstown (Natal)	20-30 cm hoch, kräftig	rotbraun, dick, eingeschnürt
P.radula (Cav.) L'Herit. ex Ait.	Versuchsgarten CSIR-Pretoria	15 cm hoch, kleinwüchsig	hellbraun, dünn
P.salmonium hort.	Versuchsgarten CSIR-Pretoria	10 cm klein- wüchsig	hellbraun, kurz, schmal
P.sidaefolium R.Knuth	Fort Beaufort (Natal)	20-30 cm hoch, kräftig	dunkelrot, knollig verdickt
P.triste (L.) L'Herit. ex Ait.	Kapprovinz	10 cm hoch	rotbraun, ver- dickt
P.zonale (L.) L'Herit. ex Ait.	Grahamstown (Natal)	1 m hoch, buschartig	klein, kurz, hell- bzw. rotbraun

B. Allgemeine Arbeitsmethoden

I. Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur (20 - 24°C) auf Papier 2043 b Mgl der Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel, und auf Whatman Papier Nr. 1 durchgeführt.

Eindimensionale Papierchromatographie

Laufmittel:

Zucker

n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)³⁸⁾ (Oberphase)
Äthylacetat/Eisessig/Ameisensäure/Wasser (18:3:1:4)
Äthylacetat/Pyridin/Wasser (2:1:2)

Cumaringlykoside

n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:2:1), 4:1:5 Oberphase)³⁸⁾
sek. Butanol/Wasser gesättigt
2%ige Essigsäure

Anthocyanidine

Ameisensäure (90%)/3n-HCl (1:1)
Essigsäure (2%)

Zweidimensionale Papierchromatographie

Laufmittel:

n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) (Oberphase)	1. Laufrichtung
Methanol/Benzol/Benzin (100:5:5)	2. Laufrichtung
sek. Butanol/Wasser gesättigt	1. Laufrichtung
2%ige Essigsäure	2. Laufrichtung

Sprühreagenzien

Zucker

Anilinphtalatlösung¹⁴⁸⁾ (0.93 g Anilin und 1.66 g Phtalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst.
Nachbehandlung: Einige Minuten auf 100°C erhitzen.

Gerbstoffe und Leucoanthocyanidine

Ammoniakalische Silbernitratlösung¹⁴⁹⁾
(14 g AgNO₃ werden in 100 ml Wasser gelöst. Es wird solange

6n-NH₃ dazugegeben, bis sich das gebildete Silberoxid eben wieder löst).

p-Toluolsulfonsäure¹⁵⁰⁾

(3%ige äthanolische Lösung 5 Min. auf 80 - 100°C erhitzen).

Bisdiazotiertes Benzidin³¹⁾

(3 Teile einer 10%igen wässrigen NaNO₂-Lösung und 2 Teile einer Benzidinhydrochloridlösung (62 g Benzidin in 14 ml conc.HCl und 980 ml Wasser) unmittelbar vor Benutzung mischen).

II. Kieselgel-Dünnschichtchromatographie

14 g Kieselgel H (Fa.Merck) wurden mit 45 ml Wasser angerührt und auf 5 Glasplatten (10 x 20 cm) ausgestrichen.

Aktivierung der Platten bei 120°C (45 Min.).

Kieselgelfertigplatten F 254 Merck.

Laufmittel für

Drogengesamtauszüge (methanol. oder wässrig)

n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:2) (4:1:5) Oberphase

Äthylacetat/Methanol/Wasser (100:18:14)

n-Propanol/Äthylacetat/Wasser (7:1:2)

n-Butanol/Äthanol/Wasser (5:1:4 Oberphase)

Chloroform/Methanol (8:2) (9:1)

Cumarine (Aglykone)

Benzol/Äthylacetat (4:1) (6:4)

Benzol/Äthanol (8:2)

Benzol/Äther (1:1)

Benzol/Aceton (7:3)

Benzol/Butanol (9:1)

Benzol/Methanol (9:1)

Benzol/Propanol (9:1)

Chloroform/Aceton (9:1)

Chloroform/Äthylacetat (7:3)

Chloroform/Methyläthylketon (8:2)

Toluol/Äthylacetat (5:4) (1:1)(9:1)

Methanol/Äthylacetat (1:3)

Flavone

Chloroform/Aceton/Toluol (25:35:40)

Chloroform/Aceton/Äthylacetat (7:2:1)

Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser (10:2:3)

Säuren und Flavone

Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure (5:4:1)
Toluol/Chloroform/Aceton (40:25:35) ⁹³⁾

Sterine

Benzol/Aceton (7:3)
Toluol/Äthylacetat (5:4)
Chloroform p.A.

Gesamtlipide

Benzol/Aceton/Wasser (91:30:8)
Benzol/Äthylacetat/Äther/Eisessig (80:10:10:0.3) ¹¹⁹⁾
Hexan/Äther/Eisessig (90:25:2)
Hexan/Benzol/Äther (80:20:2)

DNP-Amine

Toluol/Äthylacetat (5:4)
Chloroform/Methanol (8:2)
Benzol/Methanol (5:1)

III. Cellulose-Dünnschichtchromatographie

9 g Cellulosepulver MN 300 G (Fa.Macherey, Nagel u.Co.,
Düren) wurden mit 55 ml Wasser am Magnetrührer homogeni-
siert und auf 5 Glasplatten (10 x 20 cm) ausgestrichen.
Aktivierung der Platten bei 100°C (15 Min.).
Cellulosefertigplatten und -Cellulosefertigfolien Fa.Merck,
Darmstadt.

Laufmittel

Amine und Aminosäuren

Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (60:8:12:20)

Anthocyanidine ¹⁵¹⁾

Eisessig/conc.HCl/Wasser (30:3:10) = FORESTAL-Gemisch
Propionsäure/Ameisensäure/HCl/Wasser (2:5:1:6)
Methanol/conc.HCl/Wasser (190:1:10)

Säuren

Chloroform/Eisessig/Wasser (50:45:10)

IV. Polyamid-Dünnschichtchromatographie

Polyamid-Fertigplatten G 1600 der Fa.Schleicher u.Schüll,
Dassel. Chloroform/Methanol/Methyläthylketon (60:14:26)
Aceton/Wasser/Essigsäure (90:9.5:0.5)
2%ige Essigsäure

V. Sprühreagenzien (für II, III, IV)

a) Cumarine

Bedampfen mit Ammoniak

methanolische Kalilauge (10%ig)

Naturstoffreagenz nach NEU³⁹⁾, anschl. mit PÄG¹⁵²⁾ nachsprühen

Antimon-III-chloridlösung *) (20%ig in Chloroform)

Schwefelsäure (50%ig)

b) Flavone

Bleiacetatlösung *) (2%ig)

Eisen-III-chloridlösung *) (2%ig, methanolisch)

Naturstoffreagenz nach NEU³⁹⁾

c) Phenolcarbonsäuren

Bromphenolblau *) (45 mg in 100 ml Äthanol)

Eisen-III-chloridlösung *) (2%ig, alkoholisch)

Ammoniakalische Silbernitratlösung *) (2%ige AgNO₃-Lösung und 10%ige Ammoniakflüssigkeit aa)

d) Sterine

Liebermann-Burchard-Reaktion³⁶⁾: Chromatogramm mit gleichen Teilen Essigsäureanhydrid und Chloroform besprühen, mit einer zweiten Glasplatte, auf die in dünner Schicht Schwefelsäure aufgesprüht wurde, bedecken. Die Sterine erscheinen als charakteristische rote Flecken.

Antimon-V-chloridlösung *) (2 Teile SbCl₅ in 8 Teilen CCl₄) 5 Min. auf 120°C erhitzen)

e) Zucker

Anilinphthalat (s. PC)

Benzidin/Eisessig (0.5 g Benzidin in 10 ml Eisessig lösen, 10 ml Trichloressigsäure (40% in Wasser) zugeben und mit Äthanol auf 100 ml auffüllen.

Diphenylamin-Phosphorsäure¹⁵³⁾ (2 g Diphenylamin, 2 ml Anilin, 10 ml 85%ige Phosphorsäure mit Methanol ad 100 ml)

f) Amine

Ninhydrin¹⁵⁴⁾

Folins-Reagenz³⁵⁾

g) Lipoide, Fettsäuren

Rhodamin 6 G¹¹⁸⁾

(gleiche Volumina einer wässrigen 8%igen KOH und einer wässrigen 0.006%igen Rhodamin 6 G-Lösung werden gemischt)

h) Polyäthylenglykol (5% äthanolisch)¹⁵²⁾

*) Reagenzienliste E.STAHL¹⁵⁵⁾

VI. Präparative Chromatographie

Säulenchromatographie

1. Kieselgelsäulen

Verwendet wurde Kieselgel Merck (0.05 - 0.2 mm), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt wurde. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen/Min. bei einem Säulendurchmesser von 2 bis 12 cm.

2. Polyamidsäulen

Das Adsorbens bestand aus Ultramid B 3, Fa.BASF, Ludwigs-hafen. Zur Trennung wurde es nach folgendem Verfahren aufgearbeitet:

400 g Ultramid in eine Mischung von 400 ml Wasser/775 ml conc.HCl unter Rühren einfließen lassen. Die nach etwa 2 Stdn. entstandene gelbe Lösung mit 375 ml Wasser tropfenweise versetzen, 10 Stdn. stehenlassen, Zugabe von 400 ml CH₃OH unter kräftigem Rühren, Ausfällen der hochpolymeren Anteile durch Zugabe von 1850 ml Wasser.

Die milchig-weiße Suspension solange mit Wasser waschen, bis der pH-6 erreicht wurde, anschließend bei 60°C (Vakuum-schrank) trocknen. Korngröße 20 - 60 γ wurde durch Sieb mit der Maschenzahl 10 000/cm⁻² erreicht.

Nach Aufschläumen mit Methanol und Abdekantieren (10x) wurde abgenutscht und bei 60°C getrocknet.

3. Dünnschichtchromatographie

Die Substanzgemische (20 mg/Platte) wurden strichförmig aufgetragen, in den angegebenen Systemen entwickelt, die Fluoreszenzzonen unter dem UV-Licht markiert und nach dem Auskratzen mit organischen Lösungsmitteln extrahiert.

4. Gaschromatographie

Modell: Perkin Elmer

Säule: EGSS X 107 auf Chromosorb P 80 - 100 mesh

Trärgas: Spezial Argon Fa.Linde, Reinheit 99.99%

Papiervorschub: 5 mm/Min.

Gasdurchfluß: 40 ml/Min.

5. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung im Technikon TSM Aminosäure Ana-

lyzer bestimmt. Es kamen jeweils 0.25 mg der über Ionenaustauscher (siehe 6.) abgetrennten Aminosäurefraktion vor bzw. nach der Hydrolyse zum Einsatz.

6. Ionenaustauschchromatographie

60 g DOWEX IRC 50 (H^+ -Form) wurden aktiviert, in eine Säule gefüllt und diese mit 10 ml des unter C. IV., S.117) gewonnenen Extraktes beschickt. Durch dreimaliges Nachwaschen mit je 50 ml H_2O konnten die störenden Neutralstoffe beseitigt werden. Die am Harz haftenden Aminosäuren wurden anschließend mit $4n-NH_4OH$ eluiert. Durch Tüpfelproben mit Ninhydrin konnte festgestellt werden, daß mit 55 ml Elutionsmittel alle Ninhydrin positiven Substanzen abgetrennt waren. Die Lösungen wurden am Rotationsverdampfer bei $40^{\circ}C$ eingeengt.

V. Allgemeine physikalische Untersuchungsmethoden

1. Schmelzpunkte

Die Substanzen wurden in der Trockenpistole bei den den Schmelzpunkten angepaßten Temperaturen über Diphosphor-pentoxid getrocknet. Den Schmelzintervall bestimmten wir mit der Mikroschmelzapparatur nach Kofler. (Die angegebenen Werte sind unkorrigiert).

2. UV-Spektren

Die Ultraviolett-Absorptionsspektren wurden mit einem automatisch registrierenden Spektralphotometer Beckman-DK-2A aufgenommen. Die Schichtdicke betrug 1 cm, die Einwaage betrug etwa 1 mg auf 100 ml Methanol p.a..

3. IR-Spektren

Die Infrarot-Spektren wurden mit einem Beckman-Infrarot-Spektrometer IR 8 in Kaliumbromid gemessen. Die Konzentration betrug 1 - 1.5 mg pro 150 mg Kaliumbromid.

4. NMR-Spektren

Die Kernresonanzspektren wurden mit einem Varian A-60 Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Die Substanzmengen bewegten sich zwischen 20 und 30 mg und wurden hauptsächlich in Deuterochloroform (CDCl_3) gelöst.

5. Massenspektren

Die Spektren wurden mit einem Massenspektrographen MS 30 der Fa. AEI, Manchester, aufgenommen.

Für die Ausführung der UV-, IR-, NMR- und Massenspektren sowie für die Unterstützung bei der Interpretation danke ich Herrn O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

6. Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse wurde in einem automatischen Einkristalldiffraktometer nach Hoppe (Fa. Siemens) durchgeführt. Die Berechnung zur Strukturanalyse erfolgte auf einem Siemens 4004/150-Computer.

Für die Ausführung und für die Interpretation danke ich sehr herzlich Herrn Professor Dr. D. Abraham und Dr. H. Lotter, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung München, Abt. Strukturanalyse.

VI. Allgemeine Vorprüfungen

1. Prüfung auf Alkaloide

10 g Drogenpulver wurden durch Erwärmen am Rückfluß eine halbe Stde. mit Methanol ausgezogen, die Lösung von unlöslichen Bestandteilen abfiltriert, zur Trockene eingeeengt und in 25 ml Wasser aufgenommen. Mit einer gesättigten Zinkacetatlösung konnte der Gerbstoff ausgefällt und das überschüssige Zink durch Einleiten von Schwefelwasserstoff entfernt werden. Die klare gelbbraune Lösung wurde mit Draggendorff-Reagenz versetzt, wobei jedoch nach Erwärmen und Konzentrieren der Lösung kein Niederschlag zu erhalten war.

2. Prüfung auf Glykoside

Die unter 1. beschriebene Lösung wurde diesmal mit Fehling'scher Lösung versetzt. Es bildete sich nach kurzer Zeit ein brauner flockiger Niederschlag, der langsam in Schwarz überging. Die gleiche Lösung wurde mit 10%iger Salzsäure eine halbe Stunde lang auf dem Wasserbad hydrolysiert und nach Filtration erneut mit Fehling'scher Lösung versetzt. Der sich nun bildende Niederschlag ist voluminös und ockerfarben. Die Menge des gebildeten Niederschlages ist bedeutend größer als die des nicht hydrolysierten Extraktes.

Nachweis der Einzelzucker

10 g der Droge wurden mit Methanol erschöpfend am Soxhlet extrahiert. Die eingeeengte braune Lösung wurde

1. auf Papieren der Fa. Schleicher u. Schüll aufsteigend und

2. auf Kieselgelplatten (BEW 4:1:2) chromatographiert. Nach dem Besprühen mit Anilinphalat (1) und Diphenylamin-Phosphorsäure (2) konnte anhand der Testsubstanzen als Hauptbestandteil Glucose und Galactose und in Spuren Rhamnose nachgewiesen werden.

Das PC des Hydrolysates ließ bei gleichen Auftragsmengen einen bedeutend höheren Gehalt an Glucose und Galactose erkennen.

3. Prüfung auf Gerbstoffe

0.5 g Droge wurden mit 50%igem Äthanol (10.0 ml) 5 Min. zum Sieden erhitzt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen klar filtriert. Zu 5 ml des Filtrats wurden 5 Tropfen einer 5%igen Eisen-III-chlorid-Lösung gegeben. Die Anwesenheit der Gerbstoffe wurde durch eine dunkle grünblaue Fällung angezeigt.

Nachweis durch Chromatographie

Der methanolische Extrakt von 25 g Droge wurde weitgehend eingeeengt und in einem Zweiphasensystem ausgeschüttelt. Die eingeeengten Oberphasen wurden in zweidimensionaler Papierchromatographie untersucht. Nach dem Ansprühen mit

Benzidin-Reagenz traten vier charakteristisch angeordnete Flecken auf (siehe Seite 134 "Untersuchung des Gerbstoffanteils).

VII. Darstellung von Derivaten

1. Acetylierung

Die zu acetylierende Substanz wurde in der 10fachen Menge Acetanhydrid/Pyridin (10:1) zwischen 30 bis 60 Minuten am Rückfluß unter Rühren erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam in die 10fache Menge Eiswasser gerührt. Nachdem der Niederschlag fest geworden war (1 - 4 Stdn.) wurde er abgenutscht und aus Äthanol/Chloroform umkristallisiert.

2. Methylierung

Für 100 mg Cumarinderivat genügen meist 10 Tropfen Dimethylsulfat. Die Substanz wird in wasserfreiem Aceton gelöst, mit der 10fachen Menge Kaliumcarbonat (wasserfrei) versetzt und durchschnittlich 40 Min. am Rückfluß unter Rühren erwärmt. Anschließend wird abfiltriert und das Kaliumcarbonat mehrmals mit Aceton nachgewaschen. Das Methylierungsprodukt wird eingeengt und aus dem entsprechenden angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

VIII. Chemische Reaktionen

GIBBS-Reaktion⁷¹⁾

Zu 1 ml der gesättigten alkoholischen Lösung der betreffenden Substanz wurden 4 Tropfen einer frisch hergestellten äthanolischen Lösung von 2,6-Dichlorchinon-chlorimid gegeben, wobei die Lösung vorher mit einem Kristall Natriumacetat versetzt worden war.

C. Bereitung der Drogenextrakte

I. Petrolätherextrakt (P-1)

500 g Droge wurde auf der Schüttelmaschine mit 1 1/2 l Petroläther 3 Tg. bei Zimmertemperatur extrahiert. Die nach Abfiltrieren bzw. Abpressen erhaltene gelbe Lösung lieferte nach dem Einengen am Vakuum einen schmierigen gelben Rückstand. Der Rückstand wurde unter K. I., S. 140 auf Sterine und unter L. I., S. 141 auf Lipide untersucht.

Petrolätherextrakt (P-2)

1 kg gepulverte Droge wurde 5 Tg. mit 2 l Petroläther im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Die eingeeengte gelbe Lösung verblieb als gelber schmieriger Rückstand.

II. Acetonextrakt (A-1)

Die unter I. entfettete Droge wurde mit 1 1/2 l Aceton 3 Tg. im Soxhlet extrahiert. Die am Vakuum eingeeengte hellgelbe Lösung (50 ml) wurde zur Untersuchung der Aglykone unter D. I., S. 118 herangezogen.

III. Methanolextrakt (M-1)

Die unter I. und II. behandelte Droge wurde mit 70%igem Methanol 14 Tg. im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Der auf 500 ml eingeeengte dunkelbraune Extrakt wurde von den ausgefallenen Phlobaphenen befreit und zur Trockene eingeeengt. Ausbeute: 250 g Trockenextrakt (TE). Der in Methanol gelöste TE wurde zur Untersuchung der Glykoside nach E. I, S. 124, der in Wasser gelöste TE zur Untersuchung der Säuren nach G. I., II., III. S. 129 - 132 herangezogen.

Methanolextrakt (M-2)

Behandlung wie bei M-1 doch ohne Acetonextraktion. Ausbeute: 265 g Trockenextrakt TE (Zur Untersuchung der AGLYKONE)

IV. Wässriger Extrakt (W-1)

25 g Drogenpulver wurden 3 Stdn. mit 50 ml Wasser bei 60°C extrahiert. Die beim Einengen der klaren gelbbraunen Lösung

ausfallenden Massen wurden abfiltriert. Die aus 15 ml eingeeengte Lösung wurde zur Prüfung auf Amine bzw. Aminosäuren verwendet (siehe S. 138).

D. Strukturaufklärung von Substanz 2 (Umckalin)

I. Isolierung

250 g Trockenextrakt (TE) s. C. III., S.117) wurden in 30 ml 70%igem Methanol gelöst und die zähflüssige Masse auf Kieselgelsäulen aufgetragen.

Säulenchromatographie (S-1)

Aufgetragene Menge: 250 g/30 ml Methanol

Säulenhöhe: 40 cm

Säulendurchmesser: 10 cm

Adsorbens: Kieselgel Merck 0.05 - 0.2

Laufmittel: Chloroform/Methanol (8:2)

Tropfgeschwindigkeit: 40 Tropfen/Min.

Das Gesamteluat von 2 l wurde auf 30 ml eingeeengt und über eine zweite Kieselgelsäule (S-2) (Tropfgeschw. 20 Tr./Min.) unter den gleichen Bedingungen wie S-1 fraktioniert.

Vier Hauptfraktionen: F 1, F 2, F 3, F 4 (siehe Schema 1, S. 27)

Fraktion 1 (Aglykonfraktion) und der eingeeengte Acetonextrakt A-1 (siehe C. II., S. 117) wurden gemeinsam zur Isolierung von Substanz 2 herangezogen (380 mg Aglykongemisch). Der acetonlösliche Teil (120 mg) wurde über Kieselgel fraktioniert.

Säulenchromatographie (S-3)

Aufgetragene Menge: 120 mg/10 ml Aceton

Säulenhöhe: 40 cm

Säulendurchmesser: 4.5 cm

Adsorbens: Kieselgel/Merck 0.05 - 0.2

Laufmittelsystem: Toluol/Äthylacetat (5:4)

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/Min.

Im UV-366 nm konnte die Wanderung einer blauen, einer violetten und einer grünen Zone beobachtet werden.

Die Fraktionen (λ 40 ml) wurden dünnschichtchromatographisch überprüft und entsprechend vereinigt.

Substanz 2

Ausbeute: 14 mg (gelbes Pulver)

Das in 1 ml Aceton gelöste Pulver wurde über Kieselgelplatten (Benzol/Aceton 7:3) gereinigt. Bei einer Laufzeit von 55 Min./15 cm (Kammersättigung 40 Min. 21°C) wurde die als hellblaue Fluoreszenzzone (UV-366 nm) laufende Substanz ($R_f = 0.55$) mit 30 ml Aceton eluiert. Die aus Äthylacetat/Aceton (1:1) umkristallisierte Substanz 2 ergab ein gelbes Kristallpulver (9 mg). Schmelzpunkt 147 - 148°C.

II. Gewinnung weiterer Substanz 2 durch Hydrolyse des Gesamtextraktes

Der Trockenextrakt M-2 (250 g nach C. III., S. 117) wurde nach Lösen in 250 ml 70%igem Methanol mit 50 ml einer 10%igen HCl 1 1/2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Das blutrotgefärbte Hydrolysat wurde auf 150 ml eingeeengt, die dabei ausfallenden Phlobaphene abfiltriert. Durch Ausschüttelung mit 8 x 200 ml Äther wurden die Cumarine abgetrennt. Nach dem Trocknen der vereinigten Ätherausschüttelungen über Na-sulfat und Einengen am Vakuum verblieb ein rötlich-brauner Rückstand (Ausbeute: 698 mg). Die Trennung erfolgte über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Äthylacetat (5:4), entsprechend S-3 unter D. I., S. 118 (Ausbeute: 293 mg). Zur Reinigung wurde das Gemisch über 3 weitere Kieselgelsäulen (A), (B), (C) gegeben.

Säulenchromatographie S-4

aufgetragene Mengen: 290 mg/10 ml Aceton (A)
171 mg/ 7 ml Aceton (B)
159 mg/ 7 ml Aceton (C)

Säulenhöhe: 30 cm (A), 30 cm (B), 50 cm (C)

Säulendurchmesser: 5.5 cm (A), 5.5 cm (B), 3.5 cm (C)

Adsorbens: Kieselgel Merck 0.05 - 0.2

Laufmittelsysteme: Aceton/Äthylacetat (4:1) (A)
Chloroform/Methanol (9:1) (B)
Benzol/Aceton (7:3) (C)

Substanz 2

Ausbeute 151 mg/1000 g entfetteter Droge

Schmp.: 146 - 147°C aus Äthylacetat/50%igem Äthanol (1:10)

DC : Kieselgel/Toluol/Äthylacetat (5:4) $R_f = 0.48$

Benzol/Aceton (7:3) $R_f = 0.55$

BEW (4:1:5, Oberphase) $R_f = 0.85$

$C_{11}H_{10}O_5$ (222.20) Ber. C 59.45 H 4.54

Gef. C 59.61 H 4.42

Methoxyl-(Mikro-Zeisel): Gef. 27.66% Ber. 27.93%

C-CH₃: 3.84%

UV (Methanol p.a) λ_{Max} . 221 nm, (255), 330 (log $\epsilon = 4.1563$)

λ_{Max} . 380 nm (+Na-acetat)

IR (in KBr) μ : 3.1 (OH-Bande), 5.8 (C=O), 6.20 (konj. C=C)
6.40, 6.70 bzw. 6.75 (Aromat), 8.0 (arom.C=O)
9.8 (O-CH₃) 12.0 (γ -Schwing. der OH- und OCH₃)

NMR - 60 MHz (CDCl₃, TMS int.) (s. Abb. 13, S. 49)

H-3: $\delta = 6.23$ (d, J = 9.5 Hz) ppm; H-4: 7.94 (d, J = 9.5 Hz); H-8: 6.72 (s) $\rightarrow$ long range: 0.5 Hz = J 4/8;
OCH₃-5,6: 3.95 (s); 4.03 (s); OH-7: 6.76 (br)

MS: (s. Abb. 12, S. 45) M^+ 222 (100) (% rel. Intens.)

207(99), 194(7), 179(53), 151(38), 136(33), 133(21),
123(11), 119(16), 111(32), 108(19), 95(32), 80(60),
79(61), 69(23), 67(10), 63(45), 54(22), 51(23), 50(16),
39(23), 38(21), 28(55), 18(18), 15(56)

III. Acetylierung (Umckalinmonoacetat)

30 mg Umckalin wurden nach der Vorschrift B. VII. 1., S. 116)

(1 ml Pyridin/3 ml Acetanhydrid) acetyliert und aus absol.

Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 24 mg (66% d.Th.).

Umckalinacetat

Schmp.: 121°C

DC : Kieselgel (Toluol/Äthylacetat (5:4) $R_f = 0.58$
fahlviolett - UV-366 nm

$C_{13}H_{12}O_6$ (264.23) Ber. C 59.09 H 4.57

Gef. C 58.70 H 4.34

NMR - 80 MHz (CDCl₃, TMS int.)

H-4: $\delta = 7.93$ (d, J = 9.5 Hz) ppm; H-8: 6.85 (s, 1 Pr.);
H-3: 6.33 (d, J = 9.5 Hz); OCH₃-5,7: 3.84 (s); 4.01 (s,
6 Pr.); O-Ac-7: 2.37 (s, 3 Pr.).

MS: (s. Abb. 13, S. 49) (% rel. Intensität)
 M^+ : 264(20), 222(100), *193, 179(11), 207(70), 151(8),
 136(7), 44(20), 32(50), 28(95), 18(85)

IV. Methylierung (Umckalinmonomethyläther)

30 mg Umckalin wurden nach B. VII. 2., S. 116, (6 Tropfen Dimethylsulfat) methyliert und aus Chloroform/Äthanol (1:1) umkristallisiert. (Ausbeute: 22.4 mg 70% d.Th.).

Umckalinmonomethyläther

Schmp.: 74 - 75°C

DC: Kieselgel/Toluol/Äthylacetat (5:4) R_f = 0.74
 Benzol/Aceton (7:3) R_f = 0.59
 UV-366 nm braungelb

$C_{12}H_{12}O_5$ (236.22) Ber. C 61.01 H 5.12
 Gef. C 59.92 H 4.86

MS: (s. S. 55) M^+ : 236(100), 221(80), 193(50), 178(32),
 165(11), 163(10), 161(10), 156(15), 135(15), 107(6),
 95(15), 69(50), 28(12) 18(5)

NMR - 60 MHz-($CDCl_3$, TMS int.) - ppm (s. Abb. 16, S. 59)

H-4: δ = 7.9 (d, J = 9.5 Hz, 1 Pr.) ppm; H-8: 6.61 (s);
 H-3: 6.22 (d, J = 9.5 Hz); OCH_3 -5,6,7: 3.87 (s), 3.90 (s); 4.03 (s)

V. Synthese des 5,6,7-Methoxycumarins (siehe S. 56)

1. 5,7-Acetyl-cumin (II)

3 g Phloroglucinaldehyd, 3 g wasserfreies Natriumacetat und 25 ml Essigsäureanhydrid wurden 18 Stdn. bei 180°C am Magnetrührer unter Rückfluß gekocht. Nachdem die Farbe der Lösung von gelb nach schwarzbraun umgeschlagen hatte, wurde am Vakuum stark eingeeengt.

Die dunkelbraune Masse wurde mit 3 x 100 ml Chloroform extrahiert und die Chloroformlösungen auf 40 ml eingeeengt. Nach Zusatz von 60%igem Äthanol bildete sich ein gelbbrauner Niederschlag (a), der abfiltriert wurde. Die verbleibende alkoholische Lösung wurde stark eingeeengt und der dabei ausfallende Niederschlag (b) abgenutscht und mit (a) vereinigt. In wenig Aceton gelöst wurde das fast reine Acetyl-cumin über eine Kieselgelsäule gege-

ben, (Benzol/Äthanol 8:2) und die im UV-366 nm blau fluoreszierende Substanzzone aufgefangen. Aus Äthanol umkristallisiert zeigten die feinen weißen Kristallnadeln einen scharfen Schmelzpunkt von 137°C (Ausbeute: 2.1 g 41% d.Th.).

2. 5,7-Hydroxy-Cumarin (III)

1.5 g 5,7 - Acetoxy-Cumarin wurden in 10 ml heißem Methanol gelöst und unter Zugabe von 1 ml 0.2%iger Na-methylatlösung 45 Min. am Rückfluß gekocht. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure wurde mit 2 x 50 ml Äther ausgeschüttelt und die eingeeengte Ätherphase über Kieselgel (Benzol/n-Propanol 9:1) gereinigt. Ausbeute: 839 mg (82% d.Th.).

3. 5,7-Dimethoxy-Cumarin (IV)

800 mg 5,7-Hydroxycumarin wurden in 15 ml wasserfreiem Aceton gelöst und nach Zugabe von 1 ml Dimethylsulfat und 8 g K_2CO_3 45 Min. unter Rühren am Rückfluß bei 40°C erwärmt. Die eingeeengte von K_2CO_3 abfiltrierte Acetonlösung lieferte bereits Kristalle. Weißgelbe Acetatnadeln aus Aceton (Ausbeute: 662 mg 71.5% d.Th.). Schmp. 144-145°C.

4. 6-Hydroxy-5,7-Dimethoxy-Cumarin (V)

500 mg 5,7-Dimethoxycumarin wurden in 10 ml warmer 20%iger Kalilauge gelöst. Nach Zugabe von 120 mg $FeSO_4$ /5 ml Wasser wurde mit 20 ml Wasser versetzt und im Verlauf von 4 Stdn. langsam unter Rühren 3 g Kaliumperoxodisulfat/50 ml Wasser dazugetropft.

Nach 16 Stdn. war chromatographisch keine weitere Umsetzung nachzuweisen und es wurde nach vorsichtigem Ansäuern mit conc. Schwefelsäure mit 5 x 150 ml Äther ausgeschüttelt. Die eingeeengten Ätherphasen wurden über Kieselgel fraktioniert.

Säulenchromatographie:

Aufgetragene Menge: 205 mg/9 ml Methanol

Säulenlänge: 40 cm

Säulendurchmesser: 4 cm

Adsorbens: Kieselgel Merck 0.02 - 0.5

Laufmittelsystem: Benzol/Aceton (7:3)

Tropfgeschwindigkeit: 12 Tropfen/Min.

Die im UV-366 nm braun fluoreszierende Substanzzone wurde in 2 Fraktionen zu 30 ml aufgefangen und nach Einengen am Vakuum aus Methanol/Wasser umkristallisiert. (Ausbeute: 80.5 mg 14.9% d.Th.)

DC-Kieselgel Benzol/Aceton (7:3) $R_f = 0.57$

UV-(Methanol p.a.) $\lambda_{\text{Max.}}$ 232 nm, (255), 310, 339

+ Na-acetat $\lambda_{\text{Max.}}$ 410 nm ($\Delta + 71$)

NMR-(CDCl_3 , TMS int.) (s.Abb. 15, S. 58)

OCH_3 -5,7: $\delta = 3.95$ (s); 4.03 (s) ppm; OH-6: 5.1-5.8(br); H-3: 6.24 (d, $J = 9.5$ Hz); H-8: 6.62 (s, br) $\rightarrow$ long range J 4/8 = 0.5 Hz; H-4: 7.93 (d, br, $J = 9.5$ Hz)

5. 5,6,7-Trimethoxy-Cumarin (VI)

80 mg des 6-OH-5,7-OCH₃-Cumarins wurden in 10 ml wasserfreiem Aceton gelöst und nach Zugabe von 2 g K₂CO₃ und 0.3 ml Dimethylsulfat 25 Min. unter Rückfluß bei 40°C erwärmt. Die Acetonlösung wurde eingeeengt und das Cumarin aus Aceton p.a. umkristallisiert. Ausbeute: 72.2 mg (84.5% d.Th.).

Schmp.: 74 - 75°C

C₁₂H₁₂O₅ (236.0) Ber. C 61.01 H 5.12

Gef. C 60.72 H 5.01

NMR- und MS- }
R_f-Werte } entsprechend D. IV., S. 121)

VII. Entmethylierung⁸³⁾

a) 25 mg 5,6,7-Trimethoxy-Cumarin wurden in 10 ml Benzol gelöst und unter Zugabe von AlCl₃ (150 bzw. 250 bzw. 400 mg) am Rückfluß unter Erwärmen (30°C) 6 Stdn. lang gerührt. Bei Zugabe von 150 bzw. 250 mg AlCl₃ bildete sich ein Gemisch aus sechs Substanzen, das auch nach Erhöhung des AlCl₃-Gehaltes unverändert blieb.

b) Bei Zugabe von 1 ml Eisessig und 1 ml conc.HCl⁸⁴⁾ zu 25 mg des Trimethylcumarins ergab sich das Gemisch unter a).

UV-(Methanol p.a.) der aus der Platte (Kieselgel Benzol/Aceton(7:3), $R_f = 0.55$) eluierten Zone zeigte ein mit Substanz 2 identisches UV-Spektrum $\lambda_{\text{Max.}}$ 222 nm(255), 331.

E. Strukturaufklärung von Substanz 4 (Umckalin-7-O-glucosid, Umckalosid)

I. Anreicherung

Substanz 4 konnte aus Fraktion 3 des durch Säulenchromatographie S-1 (siehe D. I., S. 118) getrennten methanolischen Extraktes (siehe C. III., S. 117) über Kieselgel angereichert werden.

Säulenchromatographie S-5

Aufgetragene Menge: 587 mg/15 ml CH₃OH
Säulenhöhe: 53 cm
Säulendurchmesser: 6 cm
Adsorbens: Kieselgel Merck 0.02 - 0.5
Laufmittel: CHCl₃/CH₃OH (8:2)
Tropfgeschw.: 20 Tropfen/Min.

Es wurden 67 Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen:

Fraktion: 1 - 15 (keine Fluoreszenz im UV-366 nm)
16 - 31 (Substanz 4 + (Substanz 5))
32 - 48 ((Substanz 4) + Substanz 5)
49 - 54 (Substanz 5 + Substanz 7)
54 - 67 (Substanz 7 = Scopolin)

Die vereinigten Fraktionen 16 - 48 erhielten Substanz 4 und 5 in angereicherter Form. Das Gemisch ist nur in sauren Laufmittelsystemen (BEW 4:1:2) trennbar, wobei jedoch die Spaltung des Glykosides bei einem Isolierungsversuch erfolgte. R_f Subst. 4 = 0.6, R_f Subst. 5 = 0.53). Der DC-Nachweis zeigte Substanz 2 und Glucose auf.

II. Trennversuch durch Acetatbildung

300 mg Substanzgemisch wurde nach der üblichen Methode (s. B. VII. 1., S. 116) acetyliert (20 ml Essigsäureanhydrid/1 ml Pyridin). Das Acetatgemisch konnte jedoch nach dem Behandeln mit Eiswasser nicht kristallin erhalten werden. Eine Trennung der beiden chromatographisch nachweisbaren Hauptzonen (Benzol/MEK 7:3, R_f = 0.54 und 0.05) durch Ausschüttelung, Plattenchromatographie ergab keine Kristallisate.

III. Synthese des Umckalin-7-O-Glucosides (Umckalosid)

1. Vorproben

89 mg Aesculetin wurden in 10 ml einer 0.5%igen Natronlauge

unter Eiskühlung gelöst. Nach Zugabe von 206 mg β -Acetobromglucose in 10 ml Aceton wurde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 36 Stdn. war chromatographisch keine weitere Umsetzung zu beobachten. Nach Abdestillieren des Acetons wurde auf Eiswasser gegossen, abgenutscht und der gelbe Niederschlag aus Methanol umkristallisiert. (Schmelzpunkt $194 - 195^{\circ}\text{C}$). $R_f = 0.44$ (Toluol/Äthylacetat 5:4). Nach Zugabe von 4 Tropfen einer 1 n-Natriummethylatlösung und 15 Minuten Erwärmen am Rückfluß konnte nach Ansäuern mit 5 Tropfen Essigsäure chromatographisch eine vollständige Entacetylierung zum Cichoriin (7-O-Glucosid des Aesculetins) beobachtet werden. Ausbeute: 71 mg. Schmelzpunkt $214 - 215^{\circ}\text{C}$.

89 mg Aesculetin wurden mit 137 mg Silbercarbonat, 100 mg Drierite in ein Gemisch aus 5 ml Chloroform und 3 ml Chinolin eingebracht und 30 Min. unter Lichtabschluß gerührt. Nach Zugabe von 195 mg β -Acetobromglucose wurde weitere 10 Stdn. gerührt. Chromatographisch ließ sich nach 15 Stdn. keine weitere Umsetzung beobachten. Das Reaktionsprodukt wurde abfiltriert und über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Äthylacetat (5:4) gereinigt. Der Acetylzucker wurde mit Na-methylat (s.oben) behandelt. Ausbeute: 90 mg.

Ver minderung des Chinolin-Gehaltes in Abhängigkeit zur Ausbeute

AESCULETIN	β -ACETOBROMGLUCOSE	Ag_2CO_3	CHINOLIN	AUSBEUTE
MG: 178	390.34	275	129	%
45 mg	98 mg	69 mg	2 ml	73
45 mg	98 mg	69 mg	1 ml	65
45 mg	98 mg	69 mg	0.5 ml	53 (1) 51 (2) 50 (3)
45 mg	98 mg	69 mg	0.3 ml	39
45 mg	98 mg	69 mg	0.1 ml	14

2. Zuckerkupplung mit Umekalin

55.5 mg Umekalin in 4 ml Chloroform gelöst, wurden nach Zugabe von 0.5 ml Chinolin, 100 mg Drierite und 69 mg

Silbercarbonat unter Lichtabschluß gerührt. Die Reaktion lief nach Zugabe von 102.8 mg β -Acetobromglucose (Herstellung nach BARZAI u. KÖRÖSY¹⁵⁶) 15 Std. lang. Nach chromatographischer Überprüfung (alle 45 Min.) setzte sich nach zwei weiteren Stunden kein Aglykon mehr um.

Das Reaktionsprodukt, von Drierite/ AgNO_3 abfiltriert, eingengt und in CHCl_3 /Äthanol aufgenommen, wurde anschließend mit soviel Wasser versetzt, bis sich mit den zugegebenen, zur Chinolinausschüttelung notwendigen Petroläther zwei Phasen bildeten. Bei der Wasserzugabe fiel bereits ein Teil des Tetraacetylzuckers aus. Durch Ausschüttelung mit 5 x 200 ml Petroläther konnte der in der alkoholisch/wässrigen Phase verbliebene Acetylzucker vom Chinolin befreit werden. Die eingengt Lösung und der ausgefallene Acetylzucker wurden auf eine Kieselgelsäule aufgetragen.

Säulenchromatographie

Aufgetragene Menge: 98 mg/10 ml CHCl_3

Säulenhöhe: 40 cm

Säulendurchmesser: 6 cm

Adsorbens: Kieselgel Merck 0.02 - 0.5

Laufmittelsystem: Benzol/Methanol (9:1)

Tropfgeschwindigkeit: 10 Tropfen/Min.

Es wurden 45 Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen und nach chromatographischer Überprüfung vereinigt. Ausbeute: 74 mg (61% d.Th.)

Umckalin-7-O-Tetraacetyl-glucosid

Schmp. 129°C (Äthanol 90%)

DC-Kieselgel Benzol/Methanol (9:1) $R_f = 0.7$ Detektion mit einer 1%igen methanol.Pyraninlösung (= 3-Hydroxy-5,8,10-Trihydroxy-sulfonsaures Natrium)

T a b e l l e 19

Laufmittel	acetyl.Substanz 4	synthetisches Umckalin-tetra- acetyl-glucosid
Toluol/Äthylacetat (5:4)	0.48	0.47
Methanol/Äthylacetat (1:1)	0.67	0.67
Methanol/Benzol (1:9)	0.68	0.68
Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:2)	0.73	0.73
Äthylacetat/Methanol/Wasser (100:16.5:13.5)	0.77	0.78
Chloroform/Methanol (8:2)	0.81	0.80

¹H-NMR (CDCl₃, TMS int.) - 60 MHz. (siehe Abb. 17, S. 69)
 Aglykon: H-3: δ = 6.22 ppm (d, J = 9.5 Hz, 1 Pr.); H-8: 6.80
 (s, 1 Pr.); H-4: 7.88 (d, J = 9.5 Hz, 1 Pr.);
 OCH₃-5,6: 3.80 (s), 4.01 (s)
 Tetraacetyl: CH-1,2,3,4: 4.88 - 5.54 ppm (m, 4 Pr.);
 Zucker CH₂-6,6: 4.10 - 4.33 (m, 2 Pr.);
 CH₂-5: 3.8 - 4.05 (m, 1 Pr.)
 O-Ac: 2.02 - 2.12 (s, 12 Pr.)

C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄ (552.50)	Ber. C	54.2	H	5.09
	Gef. C	52.8	H	5.63

Bereits bei der Umkristallisation in abs.Äthanol/CHCl₃ war chromatographisch das Aglykon nachzuweisen.

Entacetylierung:

Die in 10 ml Methanol gelöste Substanz wurde mit 2 Tropfen einer 0.1 n-Namethylatlösung versetzt. Nach 30 Minuten konnte nach Ansäuern mit Essigsäure eine vollständige Entacetylierung festgestellt werden, die aber mit einer teilweisen Zuckerspaltung verbunden war. Die Trennung erfolgte über eine Kieselgelsäule.

Säulentrennung:

Aufgetragene Menge: 51 mg Gemisch/6 ml Methanol
 Säulenhöhe: 30 cm
 Säulendurchmesser: 6 cm
 Adsorbens: Kieselgel Merck 0.05 - 0.2
 Laufmittelsystem: Benzol/Methanol (8:2)
 Tropfgeschwindigkeit: 18 Tropfen/Min.

Es wurden 10 Fraktionen zu je 20 ml erhalten und nach chromatographischer Prüfung vereinigt. Nach Einengen am Vakuum konnte durch Lösen in Methanol das Umckalin-7-O-Glucosid als gelbes Pulver erhalten werden (Ausbeute 3 mg).

Umckalin-7-O-Glucosid

R_f = 0.61 in BEW (4:1:2) braungelber Fleck in UV-366 nm
 Schmelzverhalten: Braunfärbung oberhalb 220°C)

MS: (% rel.Intensität) (siehe Abb. 18, S.71)
 M⁺ 486(10), 268(100), 253 (15), 237 (20), 218(40), 205(20),
 187(55), 155(25), 153(15), 151(15), 149(20), 145(12), 141
 (23), 139(24), 137(25), 135(13), 129(13), 127(25), 124(12),
 123(30), 121(16), 116(15), 113(27), 111(70), 109(40), 107(13),
 101(70), 99(40), 97(80), 95(80), 93(14), 91(16), 89(20),
 85(90), 84(20), 83(85), 82(35), 81(70), 79(15), 75(36),
 74(30), 71(100), 70(40), 69(100), 68(20), 67(50), 60(10),
 57(100), 45(54), 44(18), 42(24), 41(100), 39(22), 32(55),
 29(40), 28(100), 27(22), 19(25), 18(100)

F. Strukturaufklärung von Substanz 3 (Scopoletin) und des
7-O-Glucosides (Scopolin)

I. Substanz 3

Von den nach der Säulentrennung S-3 (siehe D. I., S. 118) erhaltenen Fraktionen wurden die violett fluoreszierenden Zonen vereinigt und durch Säulenchromatographie (S-6) getrennt.

Säulentrennung (S-6)

Aufgetragene Menge: 163 mg/10 ml Aceton
Säulenhöhe: 30 cm
Säulendurchmesser: 2.5 cm
Adsorbens: Kieselgel Merck 0.02 - 0.5
Laufmittelsystem: Benzol/Aceton (8:2)
Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/Min.

Die Beobachtung der Zonenwanderung erfolgte im UV-366 nm. Substanz 3 konnte in gelben, chromatographisch reinen Fraktionen aufgefangen werden. Nach Vereinigung und Einengen der entsprechenden Fraktionen verblieb ein gelbbrauner schmieriger Rückstand (59 mg Ausbeute).

Erneute Kieselgelchromatographie in den Laufmittelsystemen: (1) Äthylacetat/Methanol (3:1), (2) Benzol/n-Butanol (9:1) und (3) Chloroform/Methyläthylketon (8:2) ergaben wie die Trennversuche über Aluminiumoxidsäulen mit Chloroform keine Kristallisate.

Gewinnung des Kristallisates durch präparative Dünnschicht-
chromatographie:

Aufgetragene Menge: 20 mg/1 ml Aceton pro Platte (Gesamt:
59 mg)
Adsorbens: Kieselgelplatten selbstgestrichen
Laufmittel: Toluol/Äthylacetat (5:4)
Kammersättigung: 1 Stde. (24°C)
Laufhöhe u. -zeit: 15 cm in 85 Min.
Entwicklung: 3mal 15 cm

Die mit Aceton und Chloroform eluierte Zone kristallisierte aus Äthylacetat/Aceton/Äthermischungen (1:1:2).

Scopoletin

Ausbeute: 12 mg/1000 mg entfetteter Droge
Schmp.: 205°C

DC - Kieselgel: Toluol/Äthylacetat (5:4) $R_f = 0.31$
Benzol/Aceton (7:3) $R_f = 0.42$
Chloroform/Methanol (95:0.5) $R_f = 0.65$
BEW (4:1:2) $R_f = 0.81$

II. Isolierung und Charakterisierung von Scopolin

Die Anreicherung erfolgte über Säulentrennung S-2 (siehe D. I., S. 118). Die nach E. I., S. 124 nach Säulenchromatographie S-5 aufgetrennte Hauptfraktion 3 enthielt Scopolin in den Fraktionen 54 - 67. Die Trennung erfolgte über selbstgestrichene Kieselgelplatten.

Aufgetragene Menge: 16 mg/1 ml Methanol pro Platte (-64 mg-)

Adsorbens: Kieselgelplatten selbstgestrichen

Laufmittel: Äthylacetat/Methanol/Wasser (100:18:14)

Laufhöhe u. -zeit: 15 cm in 2 1/2 Std. bei 23°C (1 Stde. Kammersättigung)

Entwicklung: 3mal 15 cm

Die mit Methanol p.a. eluierte Zone wurde direkt zur UV-Messung verwendet.

UV(Methanol p.a.) $\lambda_{\text{Max.}}$ (230) nm, (253), 292, 340

Die hydrolytische Spaltung erfolgte durch Zugabe von 3 ml 2n-HCl und 1stündigem Erhitzen unter Rückfluß.

Dünnschichtchromatographisch konnten Scopoletin: $R_f = 0.31$

in Toluol/Äthylacetat (5:4) und $R_f = 0.81$ in BEW (4:1:2)

und Glucose nach Detektion mit Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz¹⁵³) ($R_f = 0.21$ in BEW) nachgewiesen werden.

G. Identifizierung der Säuren

I. Isolierung und Charakterisierung von Kaffeesäure

Bei der nach F. I., S.128, durchgeführten Säulentrennung S-6 wurden Kaffeesäure im Gemisch mit Scopoletin erhalten.

- a) Auftrennung durch präparative Papierchromatographie auf Bögen von Schleicher u. Schüll (40 x 40 cm). Das Gemisch (12 mg in 5 ml Methanol gelöst und in einer 3 cm hohen Bande aufgetragen) konnte durch aufsteigende Chromatographie in Butanol/wassergesättigt in die Zone Kaffeesäure ($R_f = 0.17$) und Scopoletin ($R_f = 0.8$) getrennt werden.

Kaffeesäure wurde mit Methanol p.a. eluiert und direkt zur UV-Messung verwendet.

UV (Methanol p.a.) $\lambda_{\text{Max.}}$ 245 nm, 299, 324

b) Auftrennung über Polyamidsäule

Der nach C. III., S. 117, gewonnene Trockenextrakt (TE) wurde mit 200 ml Wasser versetzt und geschüttelt. Der wasserlösliche Anteil wurde mit 5 x 100 ml Äther ausgeschüttelt, eingengt und über Polyamid chromatographiert.

Säulenchromatographie

Aufgetragene Menge: 45 mg/2 ml Wasser
Säulenhöhe: 25 cm
Säulendurchmesser: 2.5 cm
Adsorbens: Polyamid (Vorbehandlung s.S.112)
Laufmittel: 2%ige Essigsäure
Tropfgeschwindigkeit: 15 Tropfen/Min.

Die im UV-366 nm verfolgte Wanderung der blauen Fluoreszenzzone lieferte in 2 Fraktionen chromatographisch reine Kaffeesäure.

Kaffeesäure

Ausbeute: 18 mg/250 mg TE aus 1000 g Droge
Schmp.: 195°C
DC-Kieselgel: Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure (5:4:1)
DC-Nachweisreaktionen: s.Tab. 20, S. 131 $R_f = 0.47$
UV-Spektren: s.Tab. 21, S. 131

II. Isolierung und Charakterisierung von Chlorogensäure

Der nach G. I. a), S. 129, wasserlösliche Anteil des Trockenextraktes wurde mit 4 x 100 ml Äthylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten und am Vakuum zur Trockene eingengten Äthylacetatphasen wurden in Methanol p.a. aufgenommen und über eine Polyamidsäule fraktioniert.

Säulentrennung

Aufgetragene Menge: 34 mg/7 ml Methanol
Säulenhöhe: 35 cm
Säulendurchmesser: 2.5 cm
Adsorbens: Polyamid (vorbehandelt nach S. 112)
Tropfgeschwindigkeit: 15 Tropfen/Min.
Laufmittel: Aceton/H₂O/Essigsäure (96:9.5:0.5)

Von 8 Fraktionen (a. 20 ml) enthielt eine Fraktion nach chromatographischer Überprüfung reine Chlorogensäure. Die eingengte und in wenig Methanol p.a. aufgenommene Fraktion wurde direkt zur UV-Messung verwendet.

Chlorogensäure

UV (Methanol p.a.) $\lambda_{\text{Max.}}$ 245 nm, 323

Ausbeute 1.12 mg (über Phosphorpentoxid getrocknet und zu einem KBr-Preßling verarbeitet)

IR- (KBr) 1700 cm^{-1} Estercarbonyl

DC-Kieselgel: Äthylacetat/Ameisensäure/ H_2O (10:2:3) $R_f = 0.65$

DC-Nachweisreaktion: s.Tab. 20

UV-Spektren: s. Tab. 21

T a b e l l e 20

Qualitative Nachweisreaktionen für Kaffee- und Chlorogensäure

	Kaffeensäure	Chlorogensäure
UV-Fluoreszenz	blau (strahlend)	fahlblau (matt)
/+ NH_3	Intensivierung	grünlichblau
/+ wässrige KOH	blaugrün	blau (matt)
/+ Naturstoffreagenz/PÄG	blau (strahlend)	gelbgrün(intensiv!)
Tageslicht:		
+ 1% meth. FeCl_3	graugrün	graugrün
+ bas.Bleiacetat	gelb	grüngelb
Ammoniak	grau	grau
NaNO_2 Essigsäure	rotbraun	gelbbraun $\xrightarrow{0.05\text{ n KOH}}$ rotbraun

T a b e l l e 21

	Maxima			Verschiebungen		
	I	II	III	I	II	III
KAFFEESÄURE	242	300	326	-		
+NaAc	231	288	318	-11	-12	-8 !
+NaAc + AlCl_3	231	305	315	-11	+ 5	+19 !
+ AlCl_3	230	266	371	-12	-34	+45
+ H_3BO_3 +NaAc	231	295	329	-11	- 5	+ 3
CHLOROGENSÄURE	243		328			
+NaAc	229		338	-14		+10 !
+NaAc + AlCl_3	229	267	374	-14		+46 !
+ AlCl_3		258	356			+28
+ H_3BO_3 +NaAc	229	297	349	-14		+21

III. Charakterisierung von p-Cumarsäure, Protokatechusäure

und Phloroglucin

Die Säuren waren chromatographisch in Fraktionen von S-2 (s. D. I., S. 118) nachzuweisen. R_F -Werte siehe Tabelle 22, Detektion mit FeCl_3 -Reagenz.

Cellulosefertigplatten

(1) Chloroform/Eisessig/Wasser (C/E/W) (50:45:5)⁹³⁾

Kieselgelfertigplatten Merck F 254

(1) Toluol/Chloroform/Aceton (T/C/Ac) (40:25:35)⁹³⁾

(2) Butanol/Eisessig/Wasser (BEW) (4:2:1)

(3) Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser (Ä/A/W) (10:2:3)

Polyamidplatten (selbstgestrichen)

(1) Chloroform/Methyläthylketon/Methanol (C/MÄK/MeOH) (60:26:14)⁹³⁾

T a b e l l e 22

Substanz	Cellulose (C/E/W)	Kieselgel		Polyamid (C/MÄK/MeOH)
		1) 2) 3)	T/C/Ac BEW Ä/A/W	
Phloroglucin	0.29	1)	0.17	0.42
Protokatechusäure (+ $\text{FeCl}_3 \rightarrow$ grün)	0.62	1) 2) 3)	0.21 0.67 0.89	0.40
p-Cumarsäure (+ $\text{FeCl}_3 \rightarrow$ grünlich)	0.92	1) 2) 3)	0.38 0.82 0.78	0.57

IV. Versuch einer Charakterisierung von Substanz 5

In der nach E. I., S. 124, über Säulenchromatographie S-5 erfolgten Fraktionierung war in Fraktion 31 - 54 angereichert Substanz 5 nachweisbar.

Die eingeeengten Fraktionen wurden mit Wasser extrahiert, die Wasserphase mit Äthylacetat und Chloroform geschüttelt. Die in der Wasserphase verbleibende Substanz 5 ergab nach dem Einengen am Vakuum ein gelbes Pulver.

Substanz 5

DC: Kieselgel/BEW (4:1:2) $R_f = 0.51$ blaue(!) Fluoreszenz
UV-366 nm

Schmelzverhalten: Braunfärbung oberhalb 240°C

UV (Methanol p.a.) $\lambda_{\text{Max.}}$ (255) nm, 323

IR (KBr) 3400 cm^{-1} (OH- in H-Brückenbindung von Carbonsäuren)
 1675 cm^{-1} (C=O), 1480, 1585 cm^{-1} (Aromat)

H. Isolierung und Identifizierung der Flavone

Die Flavone Quercetin und Kämpferol waren in dem nach C. III., S. 117, über Säulenchromatographie S-2 (D. I., S. 118) aufgearbeiteten methanolischen Extrakt (M-2) in der Hauptfraktion F 1 und F 2 enthalten. Die Anreicherung erfolgte über erneute Säulentrennung.

Aufgetragene Menge: 51 mg/7 ml Aceton

Säulenhöhe: 32 cm

Säulendurchmesser: 4 cm

Adsorbens: Kieselgel Merck 0.02 - 0.5

Laufmittelsystem: Toluol/Aceton/Chloroform (40:35:25)

Tropfgeschwindigkeit: 20 Tropfen/Min.

Die aufgefangenen Fraktionen wurden nach chromatographischer Prüfung in zwei Hauptfraktionen mit jeweils angereichertem Quercetin und Kämpferol vereinigt. Die Trennung erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie.

Aufgetragene Menge: 16 mg Quercetinfraktion/1 ml Aceton
5 mg Kämpferolfraktion/1/2 ml CHCl_3

Adsorbens: Kieselgelplatten (selbstgestrichen)

Laufmittel: Toluol/Aceton/Chloroform (40:35:25)

Laufhöhe u. -zeit: 15 cm in 65 Min. (1 Stde. Kammersättigung 23°C)

Entwicklung: 3mal 15 cm

Die beiden mit Methanol p.a. eluierten Zonen wurden direkt zur UV-Messung verwendet.

Quercetin

UV (Methanol p.a.)

$\lambda_{\text{Max.}}$ 266 nm, 373

Kämpferol

$\lambda_{\text{Max.}}$ 266 nm, 368

DC: Kieselgel/Polyamid/Cellulose (Tab. 23, S. 134)

Kämpferolglykoside

Ausbeute: 2 mg Gemisch/1000 g Droge

Zur Hydrolyse wurde das Gemisch in 5 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 3 ml einer 2n-HCl 45 Min. unter Rückfluß hy-

drolysiert. Nach Neutralisieren mit DOWEX wurde mit CHCl_3 ausgesch., eingengt, in Methanol p.a. aufgenommen und das UV-Spektrum gemessen ($\lambda_{\text{Max.}}$ 266 nm, 367). In dem auf 20 μl eingengten wässrigen Rückstand ließen sich dünnschichtchromatographisch Glucose und Rhamnose nachweisen.

DC-Kieselgel: BEW (4:1:2) R_f Gluc. = 0.17, R_f Rhamn. = 0.4
Detektion: Diphenylamin-Phosphorsäure¹⁵³⁾

T a b e l l e 23

Laufmittelsysteme	Adsorbens	QUERCETIN	KÄMPFEROL
		R_f - Werte	
Toluol/Chloroform/Methanol (40:25:35)	Kieselgel	0.27	0.42
Toluol/Äthylacetat (50:40)	Kieselgel	0.07	0.26
Benzol/Äthylacetat (30:10)	Kieselgel	0.03	0.04
Äthylacetat/Ameisensäure/ Wasser (10:2:3)	Kieselgel	0.99	0.93
Chloroform/MÄK/Methanol (60:25:14) 95)	Polyamid	0.11	0.26
Chloroform/Eisessig/Wasser (100:45:5) 95)	Cellulose	0.34	0.74

I. Aufklärung des Gerbstoff-Anteils

Der unter "Allgemeine Vorprüfungen" S. 115 nachgewiesene Gerbstoffanteil wurde aus dem methanolischen Gesamtextrakt (M-2, S.117) bestimmt.

I. Abtrennung und Gehaltsbestimmung

15 g des Trockenextraktes ergaben mit 20 ml 70%igem Methanol einen zähflüssigen Brei, der mit Wasser (Äthylacetat gesättigt) ad 100 ml aufgefüllt wurde. Es wurde nun zehnmal mit jeweils 100 ml Äthylacetat (Wasser gesättigt) ausgeschüttelt und die einzelnen Oberphasen papierchromatographisch untersucht.

Papierchromatographie

Papier: Whatman Paper Nr. 1 (40 x 40 cm)
 Kammer (Glas): 50 x 50 cm, in die jeweils 5 PC-Bögen an Stangen mit Klammern befestigt, eingehängt wurden.
 Laufmittelsystem: 1. Laufrichtung sek. Butanol/H₂O gesättigt
 Laufhöhe 30 cm in 14 Stdn.

2. Laufrichtung 2%ige Essigsäure
 Laufhöhe 23 cm in 6 Stdn.

- Detektion: (1) Ammoniakalische Silbernitratlösung (s.S. 108)
 Das DC muß nach dem Besprühen mit 2 l dest. Wasser und anschließend mit 1 l einer 0.1%igen Na-thio-sulfatlösung gewaschen werden.
 Um ein klares Bild zu erhalten, wurde das PC 1 Stde. unter fließendem Wasser gehalten. Nach Lufttrocknung erschienen die Verbindungen als grauschwarze Flecken.
- (2) p-Toluolsulfonsäure (s.S. 109)
 Nach dem Besprühen und Erhitzen bei 80 - 100°C (5 Min.) werden rötlich-gelbe bzw. bräunliche Flecke sichtbar.
- (3) Bisdiazotiertes Benzidin (s.S. 109)
 Das frisch bereitete Sprühreagenz ergibt etwa 3 Min. nach dem Aufsprühen gelbliche Zonen. Es muß mit 3 l Wasser nachgewaschen werden (cancerogene Substanz!).

Aufklärung:

- (1) Überlagerungschromatogramme mit authentischen Testsubstanzen (Tab. 24).
- (2) Charakteristische R_F-Unterschiede der korrespondierenden Paare nach Besprühen mit Benzidin-, p-Toluolsulfonsäure- und amal. Silbernitratlösungen.

T a b e l l e 24

Papierchromatographie (+)-Katechin (-)-Epika- (+)-Gallo- (-)-Epigal- -zweidimensional- techin catechin lokatechin				
1. Laufrichtung (23 cm)	19.6	15.0	12.5	8.5
R _F -Wert	0.85 ₂	0.65 ₂	0.50 ₅	0.30 ₆
R _F -Unterschied	0.20		0.20	
2. Laufrichtung (30 cm)	12.5	10.0	11.5	9.0
R _F -Wert	0.41 ₆	0.33 ₃	0.38 ₃	0.30 ₀
R _F -Unterschied	0.08		0.08	

Gehaltsbestimmung:

- Reagenzien: (1) **MALVEZIN:** 10 g Zinkoxid in der eben erforderlichen Menge verdünnter Essigsäure lösen. Solange Zusatz von 10%iger Ammoniaklösung, bis der anfänglich entstehende Niederschlag wieder in Lösung geht, Ergänzung mit Wasser ad 1000 ml.
- (2) **FOLIN:** Natr.wolfr. 100.0; Phosphorsäure 85% 80.0 und 750 ccm H₂O 3 Stdn. kochen u. ad 1000 ml H₂O auffüllen.

2.51 g Umcka-Droge bzw. Pelargonium-Wurzeln wurden je 3mal mit 30 ml Wasser ausgekocht und genau ad 100 ml Wasser aufgefüllt. 10 ml dieser Verdünnung wurden in einem Zentrifugenglas mit 5 ml basischer Zinkacetatlösung nach MALVEZIN (1) versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, in 0.2 ml 5%iger Schwefelsäure gelöst und mit Wasser auf 10 ml ergänzt.

1 ml der schwach schwefelsauren Lösung wurde mit 0.5 ml Phosphorwolframsäure-Reagenz nach FOLIN (2) versetzt und mit gesättigter Nacarbonatlösung auf 10 ml aufgefüllt. Die entstehende tiefblau gefärbte Lösung wird gegen einen Blindwert bei 726 mμ/Schichtdicke 1 ccm im ZEISS-Spektral- bzw. HITACHI-Photometer gemessen. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe einer Tannin-Eichgeraden.

Messungen (Mittelwerte aus drei Messungen)

	Extinktion (E)	%-Gehalt
Umckaloabo-Droge	0.99	9.3
Pelargonium reniforme	0.98	9.2
Pel.betulinum	0.94	8.9
Pel.hirtum	0.77	7.3
Pel.myrrifolium	1.08	10.2
Pel.luridum	0.96	9.1
Pel.sidaefolium	1.27	12.0

II. Hydrolyse zur Charakterisierung der Leucoanthocyanidine

Von den in Tabelle 25, S. 137, aufgeführten Pelargoniumarten wurden jeweils 25 g Drogenpulver mit 100 ml 70%igem Methanol 3 Tg. kalt extrahiert. Die eingeeengten methanolischen Lösungen ergaben Trockenextrakte zwischen 5.9 und 1.1 g. 3 mg eines jeden Extraktes wurden getrennt in einem Druck-Teströhrchen mit 4 ml einer Mischung aus 3n-HCl/Isopropanol (1:4) gelöst und 10 Min. im Wasserbad bei 95°C hydrolysiert. Bei allen Pelargonium-Arten traten bereits nach 5 Min. ein violettertroter

Farbstoff auf. Nach Einengen auf etwa 1 ml wurde direkt auf Papierbögen Whatman Nr. 1 aufgetragen und absteigend in 90%iger Ameisensäure/3 n-HCl (1:1) chromatographiert.

Cyanidin

R_f = 0.22 auf PC in 90%iger Ameisensäure/3 n-HCl (1:1)

R_f = 0.20 auf PC in 2%iger Essigsäure

R_f = 0.5 auf PC in Forestalgemisch

R_f = 0.49 auf Cellulose-Fertigplatten im Forestalgemisch

R_f = 0.30 auf Cellulose-Fertigplatten im Propioniegemisch

UV (Methanol p.a.) $\lambda_{\text{Max.}}$ 545 nm

UV-Floreszenz nach Lufttrocknung des PC: violettrot (366 nm)

Vorkommen in allen untersuchten Pelargonium-Arten und in den beiden Geranium-Arten, nicht aber in der Monsonia-Art, die zum Vergleich herangezogen wurden (Tabelle 25).

T a b e l l e 25

Pelargonium	Cyanidin	Anthocyanidin (unbekannt)
P.betulinum	+++	++
P.capitatum	++++	+++
P.cucullatum	+++++	++
P.hirtum	++	+
P.moreanum	++	+
P.myrrifolium	++++	+++
P.salmoneum	++	(+)
P.reniforme	+++++	+++
P.sidaefolium	+++++	+++
P.triste	+++	++
P.zonale	++	+
G.incanum	++	+
G.robustum	++++	+
Monsonia-Art	-	-

+++++ = sehr stark

+ = noch wahrnehmbar

II. Spaltung der kondensierten Tannine

200 mg der Tannine, die bei Einengung des meth. Gesamtextraktes ausgefallen waren, werden in 20 ml Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 30 mg Thio glykolsäure ($\text{SH-CH}_2\text{-COOH}$) wird die Lösung mit etwas 8 ml 2n-HCl auf einen pH-Wert von 4 gebracht. Die Lösung wurde unter Rückfluß 2 1/2 Stde. auf dem Wasserbad erwärmt.

Nach Zugabe von 15 ml einer 5%igen Kaliumhydrogencarbonatlösung wurde mit 3 x 100 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten und eingedampften Ätherextrakte wurden papierchromatographisch untersucht. PC-zweidimensional:

(+)-Katechin R_{f1} = 0.86, R_{f2} = 0.42

(-)-Epikatechin R_{f1} = 0.68, R_{f2} = 0.36

PC-90% Ameisensäure/3n-HCl (1:1) Cyanidin R_f = 0.23

J. Aufklärung der biogenen Amine

I. Isolierung

Die nach B. VI. 6., S.113, erhaltene Aminfraktion (pH=10) wurde zur Trockene eingeeengt, in 80%igem Äthanol aufgenommen und die dabei auftretende Trübung abzentrifugiert.

DC-Cellulose: Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (60:8:12:20)

$R_f = 0.33$ (Äthanolamin), $R_f = 0.70$ Tyramin

Detektion: (1) ^{14}N inhdrinlösung, (2) Folin-Reagenz, s.S. 111)

II. Umsetzung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB)

10 mmol des Amingemisches wurden mit 30mmol DNFB in 30 ml Aceton, 10 mmol NaHCO_3 in 50 ml H_2O versetzt und 40 Min. bei 60°C erwärmt. Nach dem Abkühlen unter Zusatz von 0.5 g festem NaHCO_3 konnten die DNP-Amine mit 150 ml Äther extrahiert werden. Das eingeeengte DNP-Amingemisch wurde durch präparative Kieselgelchromatographie getrennt.

Aufgetragene Menge: 6.5 mg/1 ml Aceton/pro Platte

Adsorbens: Kieselgelfertigplatte Merck

Laufmittel: Toluol/Äthylacetat (5:4)

Laufhöhe u. -zeit: 15 cm/55 Min. (Kammersättigung 40 Min./ 21°C)

DNP-Tyramin

Ausbeute: 4 mg (gelbe Nadeln aus Aceton/Methanol (7:3))

Schmp.: 168°C

DC-Kieselgel: Toluol/Äthylacetat (5:4) $R_f = 0.65$

Benzol/Methanol (9:1) $R_f = 0.35$

Tageslicht: als gelbe Flecke sichtbar)

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_5\text{N}_3$ (303.29)	Ber. C	55.4	H	13.22	N	10.0
	Gef. C	51.3	H	3.47	N	14.9
		51.6	H	3.37	N	15.0

(Die Umsetzung mit DNFB ist noch nicht geklärt, wahrscheinlich reagiert im Falle des Tyramins die Hydroxylgruppe ebenfalls mit DNFB. Untersuchungen laufen zur Zeit in unserem Arbeitskreis¹⁵⁷).

UV-(Methanol p.a.)- zur Lösung des DNP-Tyramins sind 24 Std.

$\lambda_{\text{Max.}}$ 347 nm (262) bei 40°C erforderlich.

DNP-Äthanolamin

DC-Kieselgel: Toluol/Äthylacetat (5:4) $R_f = 0.32$

Benzol/Methanol (9:1) $R_f = 0.11$

III. Gehaltsbestimmung von Tyramin und Äthanolamin

5.1 g Drogenpulver/50 ml H_2O wurden 2 Stdn. bei $60^{\circ}C$ extrahiert. Nach dem Abfiltrieren und mehrmaligem Waschen des Drogenpulvers wurde nach chromatographischer Prüfung auf Vollständigkeit der Extraktion auf 10 ml eingeeengt. Die Gewinnung der Aminfraktion (Dowex IRC 50 (100 g) erfolgt analog der Isolierung I., S. 138. Die Aminosäuren wurden mit 5 x 40 ml Wasser ausgespült.

Die Aminfraktion wurde nach Einengen am Vakuum in 80%igem Äthanol aufgenommen, die entstehende Trübung zentrifugiert, der Niederschlag mit Äthanol gewaschen, die vereinigten Lösungen erneut eingeeengt und der Vorgang solange wiederholt, bis die alkoholische Lösung klar blieb.

Es wurde auf 1 ml eingeeengt und in einem 2 ml Meßkölbchen zur Marke mit Äthanol aufgefüllt.

1) Tyraminstammlösung

0.0122%ig (12.2 mg/100 ml 80%igem Äthanol)

2) Äthanolaminstammlösung

0.1 ml Äthanolamin (Dichte $1.022/20^{\circ}C$)/100 ml 80%igem Äthanol (a)

0.1 ml von (a) ad 100 ml Äthanol 80% verdünnt = Stammlösung 0.0001% (= 102.2 μg /100 ml)

Bestimmung über Plattentrennung mit visuellem Vergleich

Cellulosefertiglplatten (12 cm in 4 Stdn.)

n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (60:8:12:20)

Ninhydrin-Reagenz (10 Min./ $90^{\circ}C$)

$R_f = 0.7$ (Tyramin), $R_f = 0.28$ (Äthanolamin)

Aufgetragene Mengen μl :

Tyraminstammlösung: 6 μl (0.73 μg), 7 (0.85), 8 (0.97),
9 (1.1), 10 (1.22), 11 (1.34)

Prüflösung: je 3 x 0.001 ml

Ergebnis: 0.001 ml Prüflösung entsprechen 8.5 μl Stammlösung = 1 μg in 0.001 ml. Bezogen auf 2 ml Drogenauszug/5 g Droge ergibt sich der Gehalt als 2 mg/5 g Droge (0.04%)

Äthanolaminstammlösung: 10 μl (0.0101 μg), 20 (0.0202), 30 (0.03), 40 (0.04), 50 (0.05), 60 (0.06)

Prüflösung: je 3 x 0.02 ml

Ergebnis: 0.02 ml entsprechen etwa 47 μl Stammlösung = 0.047 μg in 0.02 ml. Bezogen auf 2 ml Drogenauszug/5 g Droge ergibt sich der Gehalt als 4.7 μg /5 g Droge (0.00009%)

Die Ergebnisse wurden durch Extinktionsmessungen über die DNP-Derivate von RÖMHILD 157) bestätigt: Tyramingehalt: 0.00169 g/5 g Droge und Äthanolamingehalt = 0.000 00575 g/5 g Droge

K. Klärung der Sterine

I. Isolierung

Aus dem gelben Rückstand des Petrolätherauszuges P-1 (s. C. I., S.117) wurde nach Extraktion mit 5 x 50 ml Aceton und Einengen der Acetonlösungen 250 mg Sterin gewonnen. Der gelbe Kristallbrei (Umkrist. aus Aceton/Wasser (9.5:0.5)) zeigte uneinheitliches Schmelzverhalten.

Sterin

Ausbeute: 250 mg Sterin/500 g Droge
Schmp.: 115 - 121°C (gelber Kristallbrei aus Aceton/Wasser (9.5:0.5))

DC-Kieselgel: Benzol/Aceton (7:3) $R_f = 0.52$

NMR (CDCl₃, TMS int.)

tert.CH₃- $\delta = 0.55$ (s), 0.79 (s) ppm, sek.CH₃-: 1.02 (s),
CH₂-: 0.8-2.5 (m), 3.3-4.5 (m), Vinyl-: 5.13³(m)

II. Sterinacetat

Zur Reinigung wurde nach der Methode s.S.116 acetyliert (250 mg Sterin/0.5 ml Pyridin/2 ml Essigsäureanhydrid 30 Min. bei 50°C erhitzt).

Ausbeute: 200 mg (farblose Plättchen aus Äthanol/Petroläther
Schmp.: 173 - 174°C (9:1))

DC-Kieselgel: Benzol/Aceton (7:3) $R_f = 0.7$

NMR (CDCl₃, TMS int.) Acetyl-: 2.03 (s) (sonst siehe Sterin-Signale)
MS-: M⁺ 456 und M⁺ 454 (Gemisch)

III. Selektive Hydrierung¹¹⁴⁾

70 mg Sterinacetat wurden mit 40 mg PdCl₂ in 12 ml wasserfreiem Äthylacetat hydriert. Nach 5 1/2 Stdn. war ein Äquivalent Wasserstoff adsorbiert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen zur Trockene am Vakuum wurde das Sterinacetat aus Äthanol/Petroläther (9:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 54 mg (77% d.Th.).

β -Sitosterinacetat

Schmp.: 128 - 129°C

DC-Kieselgel: Benzol/Aceton (7:3) $R_f = 0.70$
Benzol/Äthylacetat $R_f = 0.73$
(3:2)

Detektion: Phosphormolybdänsäure
Formaldehyd-Schwefelsäure (10 Min. 110°C)
(schwarzblaue Flecken)

MS- M⁺ 456

(% rel.Intens.) 396(100), 147(38), 81(33), 43(41)
 (% rel.Intensität zwischen 10 bis 25): 459, 458, 398,
 397, 382, 381, 275, 216, 215, 213, 121, 120, 109, 107,
 105, 95, 93, 71, 69, 67, 57, 55, 41

IV. Gewinnung des β -Sitosterins aus dem unverseifbaren Anteil

Der wasserlösliche Anteil von 90 g Trockenextrakt (s. C. III. (M-2), S.117, wurde 1 1/2 Std. mit 10%iger Kalilauge am Rückfluß verseift. Die abgekühlte und mit Wasser verdünnte Lösung wurde mit 12%iger HCl auf pH 6 gebracht und mit 5 x 250 ml Äther ausgeschüttelt. Nach Abtrennung des sauren Anteils und vorheriger Neutralisation wurde nochmals mit 1000 ml Äther ausgeschüttelt. Nach Abdestillierung des Äthers wurde der verbleibende Rückstand in 30 ml 70%igem Äthanol aufgenommen.

Säulenchromatographie

Aufgetragene Menge: 58 mg/15 ml Äthanol

Säulenhöhe: 25 cm

Säulendurchmesser: 3 cm

Adsorbens: Kieselgel Merck 0.02 - 0.5

Laufmittel: Petroläther/Äther (1:1)

Äther

Tropfgeschwindigkeit: 18 Tropfen/Min.

Vor der Fraktionierung wurde die Säule mit 1 l Petroläther/Äthermischung von löslichen Anteilen befreit. Das aufgetragene Gemisch wurde solange mit Petroläther/Äther (1:1) fraktioniert, bis eine deutliche Zonierung auftrat. Die weitere Fraktionierung erfolgte dann mit Äther. Es wurden 8 Fraktionen zu 50 ml aufgefangen. Nach chromatographischer Überprüfung enthielt F 6 (und F 7) reines β -Sitosterin.

β -Sitosterin

Ausbeute: 30 mg/90 g TE (= 360 g Droge)

Schmp.: 137°C (abs.Äthanol)

DC-Kieselgel: CHCl₃ p.a. R_f = 0.32; Benzol/Aceton (7:3) R_f = 0.50
 Benzol: Äthylacetat (8:2) R_f = 0.47

L. Klärung weiterer Lipide einschließlich der Fettsäuren

Die in dem Petrolätherextrakt P-1 (s. C. I., S. 117) enthaltenen Lipide wurden dünnenschichtchromatographisch mit Algen bekannter Zusammensetzung identifiziert. (Laufmittelsysteme, R_f-Werte s. S. 90, Abb. 26 und Schema 9, S. 91). Die Detektion erfolgte mit einer frisch bereiteten Rhodamin 6 G-Lösung (s.S. 111).

Darstellung der Fettsäuremethylester (Transmethylierung mit N-Natriummethylatlösung)

1 Tropfen des öligen Extraktes P-1 (22.53 mg) wurde mit 3 ml Methanol p.a. und 1.5 ml 2n-Natriummethylatlösung (4.6 g Na/100 ml CH_3OH p.a.) gelöst. Nach 25 Min. (unter wiederholtem Umschütteln) wurde nach Zugabe von 1 ml 37%iger HCl die Transmethylierung beendet. Nach dreimaligem Ausschütteln mit je 10 ml Petroläther wurde mit Wasser gewaschen und im N_2 -Strom auf etwa 2 ml eingeeengt. Zur gaschromatographischen Untersuchung wurde der Petroläther entfernt und die Fettsäuremethylester in etwa 300 μl CHCl_3 p.a. aufgenommen.

Gaschromatographie

Modell: Perkin Elmer 900

Säule: EGSS-X 107 auf Chromosorb P 80 - 100 mesh

Temp.: Säule 195°C

Einlaß 230°C

Detektor 230°C

Gasdurchfluß: 40 ml Argon/Min.

Gesamtretentionszeit: 8 1/2 Min.

Einspritzmenge: 4.2 μl

Papiervorschub: 5 mm/Min.

Detektor-Empfindlichkeit: 10 x 512

Schreiber-Empfindlichkeit: 2.5 mV

M. Veraschung und Untersuchung der Aschebestandteile

I. 2 x 20 g Umckaloabo-Drogenpulver wurden getrennt 2 Stdn. einer trockenen Veraschung im Glühtiegel unterworfen. Nach Abkühlung wurde nochmals eine 1/2 Stde. kräftig geglüht und der grauweiße Ascherückstand gewogen.

(1) 1.50 g (2) 1.45 g

Der Aschegehalt ist demnach 7.5% (1) bzw. 7.25% (2).

II. Flammenspektrophotometrische Untersuchungen

30.61 mg von (1) und 30.53 mg (2) wurden jeweils mit 1 ml conc.HCl versetzt. Die unvollständig gelösten Aschebestandteile wurden 1 Min. lang erhitzt und mit Ammoniak neutralisiert. Zur Ausfällung der störenden Phosphatmenge wurde mit überschüssiger Eisen-III-chloridlösung untervorheriger Pufferung mit NH_4 -acetat versetzt, aufgeköcht und filtriert. Die Lösung wurde mit Wasser ad 100 ml aufgefüllt.

Bestimmungen:

- (1) Natrium: 589 nm bei einer Spaltbreite von 0.08 mm
- (2) Kalium: 768 nm bei einer Spaltbreite von 0.08 mm
- (3) Calcium: 222.7nm bei einer Spaltbreite von 0.04 mm
- (4) Magnesium: 370.7nm bei einer Spaltbreite von 0.12 mm

Da Calcium in großer Menge in der Asche vorlag, wurde die Lösung für die Bestimmung 1:5 verdünnt.

Ergebnis (4)	I.	II.
K	2.62%	2.78%
Na	0.49%	0.51%
Mg	1.30%	1.27%
Ca	37.00%	37.40%

N. Pharmakologische Untersuchungen (durchgeführt im Staatl.bakteriolog. Untersuchungslaboratorium in München (Dir.Dr.med.Bl.Freytag)

I. Lochtestverfahren

Zur Anwendung kamen Kulturplatten aus Frischblutagar mit einem in der Mitte ausgestanztem Loch. Die Prüflösung wurde in 0.1 ml aufgebracht und die Prüfstämme radiär dazu ausgeimpft. Angabe der Hemmwirkung in mm/Durchmesser.

II. Röhrchenverdünnungstest

0.2 ml der gesättigten Substanzlösung wurde mit 1.8 ml Nährbouillon gemischt. Von dieser Mischung wurde die jeweils angegebene Verdünnungsreihe angelegt, die auf die ursprünglich vorliegende Substanzlösung (z.B. 1:80) bezogen wurde.

III. Prüfung auf Tuberkelbazillen

Zwei Tuberkelbakterienstämme vom Typ humanus und bovinus wurden auf Kirchner-Nährböden mit Serumzusatz gezüchtet.

Je 0.5 ml der gesättigten äthanolischen Substanzlösungen wurden mit 5 ml Kirchner-Nährböden versetzt. Diese Kulturröhrchen wurden dann mit den Tuberkelbakterienaufschwemmungen beimpft. Als Kontrolle dienten drei Kulturröhrchen mit 0.5 ml 70%igem Äthanol.

Um mit geringen Mengen der vorliegenden Substanzlösungen arbeiten zu können, wurden Schrägagarröhrchen verwendet. Die Verteilung auf der Schrägagarfläche erfolgte immer wieder während der Bebrütungszeit durch weitgehende Horizontallagerung der Röhrchen. Es erfolgte eine Ablesung in wöchentlichen Abständen.

L I T E R A T U R

- 1) Verlag JOWETT u. SOWRY, Ltd., Leeds
- 2) A.SECHEHAYE, "Umckaloabo in der inneren Behandlung der Tuberkulose", Kommissions-Verlag K.Knöllner, Buchhandlung, Reutlingen
- 3) A.SECHEHAYE, "Die Behandlung der organischen und chirurgischen Tuberkulose durch Umckaloabo", Selbst-Verlag Freiburg (1933)
- 4) A.SECHEHAYE, "L'Umcka, Son role dans le traitement de la Tuberculose", Cavadin (1954)
- 5) W.v.BOJANOWSKI, "Fortschr.d.Medizin" 11, 1 (1937)
- 6) A.T.BRYANT, "Annals of the Natal Museum", Pietermaritzburg, Vol.II, page 1 - 103
- 7) F.BERGER, Handbuch der Drogenkunde, Bd.V., S.220, Verlag W. Maudrich, Wien-Bonn-Bern (1960)
- 8) A.BRAND u. E.SCHLUND, Pharm.Ztg. 69, 597 (1924)
- 9) R.WASICKY, "Physiopharmakognosie", Verlag Carl Fromme, Wien (1933)
- 10) W.H.HARVEY, "Flora Capensis" 1, Nr. 138 (1860)
- 11) J.M.WATT u. M.G.BREYER-BRANDWIJK, "The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa", E. u.S. Livingstone Ltd Edinburgh and London, 2nd ed., 1962
- 12) F.GSTIRNER u. K.H.LISKEN, Arch.Pharm. 295, 823 (1962)
- 13) A.BUCKOVA, J.LEIFERTOVA u. L.NATHEROVA, Cesk.Farm. 14, (8), 406 (1965)
- 14) F.GSTIRNER u. W.HOCH, Arch.Pharm. 296, 97 (1963)
- 15) R.T.AXEL, R.B.RAMSEY u. H.J.NICHOLAS, Phytochemistry 11, 2353 (1972)
- 16) E.C.BATE-SMITH u. P.RIBERREAU-GAYON, Qual.Plant et Mat.Veg. 5, 1896 (1953)
- 17) T.K.CHUMBALOW u. T.N.BIKBUATOVA, Khim.Prir.Soedin. 4 (1), 67 (1968)
- 18) S.GEEGIL, Eczacilik Bulteni 6 (1) 5 (1964); 6 (1), 23 (1964)
- 19) M.AHMEDULLAH, W.H.CARPENTER u. H.L.MITCHELL, Am.Soc.Hort.Sci. 83, 769 (1963)
- 20) A.BANKOWSKI, CA, 73, 112856 (1970)
- 21) H.A.STAFFORD, J.Botany 46, 347 (1959); 48, 699 (1961)
- 22) J.GYR, Compt.Rend. 242, 1203 (1956)
- 23) R.HEGNAUER, "Chemotaxonomie der Pflanzen", Bd. 4, S. 193, Birkhäuser-Verlag Basel u.Stuttgart (1966)
- 24) J.L.van EIJK, "Phytochemisch Onderzoek van Erodium cicutarium" Diss. Utrecht (1951); Pharm.Weekblad 87, 70 (1952)
- 25) M.L.HEWAT, "Bantu Folk Lore, Cape Town: Maskew Miller (1906)
- 26) A.SMITH, "A Contribution to South African Materia Medica, Lovedale, South Africa: Lovedale Press 2 ed. (1888); 3 ed (1895)
- 27) E.P.PHILLIPS, Ann.S.Afr.Mus. 16, 1 (1917)
- 28) R.MARLOTH, "The Flora of South Africa", London: Wesley (1913)
- 29) L.PAPPE, "Flora Capensis Medicae Prodomus 2 ed. Cape Town: Brittain (1857)
- 30) F.GSTIRNER, "Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen", S. 36, Band I, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)
- 31) D.E.HATHWAY, J.chem.Soc. 520 (1958)
- 32) E.C.BATE-SMITH u. N.H.LERNER, Biochem.J. 58, 126 (1954)
- 33) H.REZNIK u. K.EGGER, Z.anal.Chem. 183, 196 (1961)
- 34) R.A.FAHMY, A.NIEDERWIESER, G.PATAKI u. M.BRENNER, Helv.Chim. Acta 44, 2022 (1961)

- 35) D.MUTING, Naturwiss. 39, 303 (1952)
- 36) C.LIEBERMANN, Ber.dtsch.Ges. 18, 1804 (1885)
- 37) P.POHL, H.GLASL u. H.WAGNER, J.Chromatogr. 49, 488 (1970)
- 38) S.M.PATRIDGE, Biochem.J. 42, 238 (1948)
- 39) R.NEU, Naturwiss. 44, 181 (1957)
- 40) H.BÖHME u. TH.SEVERIN, Arch.Pharm.Ber.dtsch.Pharm.Ges. 290/62, 285, 405, 448 (1957)
- 41) R.H.GOODWIN u. B.M.POLLOCK, Arch.Biochem.Biophys. 49, 1 (1954)
- 42) B.N.MATTOO, Transactions of the Faraday Soc. 52, 1184 (1955)
- 43) E.CINGOLANI, Gaz.Chim.Ital. 89, 999, 985 (1959); Ann.Chimic.47, 557 (1957)
- 44) B.K.GANGULY u. P.BAGCHI, J.org.Chem. 21, 1415 (1956)
- 45) K.SEN u. P.BAGCHI, J.org.Chem. 24, 316 (1959)
- 46) O.HALPERN, P.WASER u. H.SCHMID, Helv.chim.Acta 40, 758 (1957)
- 47) L.JURD, Arch.Biochem.Biophys. 66, 284 (1957)
- 48) W.BENCZE, J.EISSENBEISS u. H.SCHMID, Helv.chim.Acta 39, 923 (1956)
- 49) J.SCHMITZ, H.LANERER, R.HIRT u. M.SANZ, Helv.chim.Acta 34, 762 (1951)
- 50) A.EBNÖTHER, TH.MEIER u. H.SCHMID, Helv.chim.Acta 35, 910 (1952)
- 51) C.R.JACOBSON, K.R.BROWER u. E.D.ÄMSTUTZ, J.org.Chem. 18, 111 (1953)
- 52) J.EISENBEISS u. H.SCHMID, Helv.chim.Acta 42, 61 (1958)
- 53) H.BÖHME u. TH.SEVERIN, Arch.Pharm.Ber.dtsch.Pharm.Ges. 290/62, 486 (1957)
- 54) E.SPÄTH u. Z.JERZMANOWSKA-SIENKIEWICZOWA, Ber. 70, 1019 (1937)
- 55) E.SPÄTH u. Z.JERZMANOWSKA-SIENKIEWICZOWA, Ber. 70, 698 (1937)
- 56) E.SPÄTH u. Z.JERZMANOWSKA-SIENKIEWICZOWA, Ber. 70, 1672 (1937)
- 57) "The Ring Index", Reinhold, New York, S. 130 (1940)
- 58) E.STEINEGGER u. R.HÄNSEL in "Lehrbuch der allgemeinen Pharmakognosie", Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, S.123 (1968)
- 59) J.EISENBEISS u. H.SCHMID, Helv.chim.Acta 42, 61 (1958)
- 60) H.BUDZIKIEWICZ, C.DJERASSI u. D.H.WILLIAMS in "Structural Elucidation of Natural Products by Mass-Spectrometry", Holden-Day Inc., San Francisco, Vol. II (1964)
- 61) K.J.v.d.MERWE, P.S.STEYN u. S.H.EGGERS, Tetrahedron 3923 (1964)
- 62) M.E.PEREL'SON, Yu.N.SHEINKER, G.P.SYROVA u. K.F.TURCHIN, Khim. Priir.Soedin. 6, 6 (1970)
- 63) E.V.LASSEK u. J.T.PINHEY, J.Chem.Soc. ref.CA 2000 (1967)
- 64) T.J.BATTERHAM, J.A.LAMBERTON, Aust.J.Chem. 17, 1305 (1964)
- 65) Yu.N.SHREIKER, G.Yu.PEK u. M.E.PEREL'SON, Dokl.Akad.Nauk.SSSR, Ser.Khim. 158, 1382 (1964)
- 66) W.STECK u. B.K.BAILEY, Can.J.Chem. 47, 3577 (1969)
- 67) W.STECK u. M.MAZUREK, Lloydia, Vol. 32, No. 4, 418 (1972)
- 68) J.REISCH, J.NOVAK, K.SZENDREI u. E.MINKER, Pharmazie 22, 205 (1967)
- 69) J.B.BREDENBERG u. J.N.SHOOLERY, Tetrahedron 285 (1961)
- 70) M.W.JARVIS u. A.G.MORITZ, Aust.J.Chem. 21, 2445 (1968)
- 71) H.D.GIBBS, J.biol.Chem. 72, 649 (1927)
- 72) H.PERKINS, Ann.Chem.Pharm. 147, 229 (1868)
- 73) H.v.PECHMANN, Ber. 17, 929 (1884)
- 74) L.BERT, C.R.Acad.Sci.Paris 214, 230 (1942)
- 75) E.SPÄTH u. E.DOBROVOLNY, Ber. 71, 1831 (1938)
- 76) P.BIGINELLI, Gazz.chim.Ital. 25, II, 365 (1895)
- 77) M.CATES, J.Am.Chem.Soc. 72, 231 (1950)
- 78) A.C.METHA u. T.H.SESHADRI, J.Chem.Soc. 3823 (1954)

- 79) E.SCHMIDT u.F.FLÄCHER, Arch.Pharm. 242, 288 (1904)
- 80) C.GRAEBE u. H.HESS, Ann. 340, 237 (1905)
- 81) P.BIGINELLI, Gazz.chim.Ital. 21, II, 452 (1891)
- 82) R.MARI u. K.VENKATARAMAN, J.Sci.Ind.Res.(India), 21 B, 477(1962)
- 83) L.FARKAS, M.NOGRADI u. Z.ZUBOVICS, Acta Chim.Acad.Sci.Hung. Farm. 52 (3), 301 (1967)
- 84) K.ZECHMEISTER, X-Ray 1973, Program-System for X-Ray Cristallography, Siemens Computer 404, MPI-München
- 85) F.MAUTHNER, J.prakt.Chem. (2), 91, 174 (1915)
- 86) E.KOENIGS u. L.KNORR, Ber.dtsch.Chem.Ges. 34, 974 (1901)
- 87) O.SELIGMANN, Diss. in Vorbereitung (München 1974)
- 88) K.HERRMANN, Pharmazie 11, 434 (1956)
- 89) N.BUTLER u. S.SEIGLMANN, Nature 183, 1813 (1959)
- 90) J.B.HARBORNE, Biochem.J. 74, 270 (1960)
- 91) W.W.REID, Chem. u.Ind. 1439 (1958)
- 92) H.SCHILCHER, Diss. München 1959, 39
- 93) E.STAHL in "Dünnschichtchromatographie - ein Laboratoriums-handbuch", Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1967) s. 657
- 94) L.HÖRHAMMER u. A.SCHERM, Arch.Pharm. 288/60, 442 (1955)
- 95) J.W.CLARK-LEWIS, P.J.MORTIMER, J.chem.Soc. 4106 (1960)
- 96) D.H.-C.BARTON, A.M.DEFLORIAN u. O.E.EDWARDS, J.chem.Soc. 530 (1956)
- 97) W.E.HILLIS, Austr.J.of.Biolog.Sci. 2, 263 (1956; 2, 269 (1956)
- 98) E.BATE-SMITH, J.exp.Botany 4, 1 - 9 (1953)
- 99) G.M.ROBINSON u. R.ROBINSON, Biochem.J. 27, 206 (1933)
- 100) G.M.ROBINSON u. R.ROBINSON, J.chem.Soc. 4040 (1935)
- 101) D.ROUX, Nature 179, 306 (1957)
- 102) M.J.BETTS, B.R.BROWN u. M.R.SHAW, J.chem.Soc. 1178 (1969)
- 103) M.J.BETTS, B.R.BROWN u. W.T.PIKE, Chem.Comm. 1110 (1967)
- 104) B.O.LINDGREN, Acta chem.Scand. 4, 1365 (1950)
- 105) G.KUSCHINSKY u. H.LÜLLMANN in "Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie", G.Thieme-Verlag Stuttgart (1966), S. 43
- 106) M.FRIMMER in "Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen" F.K.Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York (1971), S.208
- 107) J.L.v.EIJK, Pharm.Weekblad 87, 425 (1952); Diss.Utrecht 1951
- 108) K.WERLE u. B.RAUB, Biochem.Ztg. 318, 538 (1948)
- 109) H.J.ILGERT u. T.HARTMANN, J.Chromatogr. 71, 119 (1972)
- 110) A.ZEMAN u. J.P.G.WIROTAMA, Z.Anal.Chem. 247, 155 (1969)
- 111) A.M.ASATOOR, J.of Chromatog. 4, 144 (1960)
- 112) D.KORDTS, R.VOIGT u. F.WEISS, Pharmazie 15, 586 (1960)
- 113) K.MAYER u. G.PAUSE, Lebensm.-Wiss.-u.Technol. Vol.5, Nr.3, 108 (1973)
- 114) A.ASKAR, Mikrobiolog.Technol.Lebensm. 2, 65 (1973)
- 115) F.ESTERNER u. K.H.LISHEN, Arch.Pharm. 295, 823 (1962)
- 116) A.BERNSTEIN u. E.WALLIS, J.org.Chem. 2, 341 (1937)
- 117) H.J.M.FITCHES in "Advances in Mass-Spectrometry", Pergamon Press London, Vol. II, 428 (1962)
- 118) C.F.ALLEN, P.GOOD, H.F.DAVIES, P.CHISUM u. S.D.FOWLER, J.Aerm.Oil Chemists' Soc. 43, 223 (1966)
- 119) J.E.STOREY u. B.TUCKLEY, Lipids 2, 501 (1967)
- 120) R.DAVOLI u. M.TERNI, Boll. Ist.sieroterap.milanese 27, 142 (1948); CA;43, 4327 (1949)
- 121) M.PASSERINI u. G.MAZZETTI, Boll. Ist.sieroterap. milanese 26, 145 (1947); CA: 43, 4327 (1949)

- 122) L.DONATELLI u. M.TERNI, Boll.Ist. sieroterap. milanese 27, 139 (1948)
- 123) M.TERNI u. Z.QUARATINI, Boll.Ist.sieroterap.milanese 30, 689 (1951); 31, 55 (1952), ref.Chem.Zbl. 1955, 2225
- 124) A.ANDERSEN u. A.BERRY, J.A., Science (N.Y.) 106, 644 (1947)
- 125) M.J.NAGHSKI, M.J.COPLEY u. J.F.COUCHE, J.Bacter. 54 34 (1947)
- 126) A.STOLL, J.RENZ u. A.BRACK, Helv.chim.Acta 33, 1877 (1950)
- 127) F.BUSTINZA u. A.C.LOPEZ, An.Jard.Botanico Madrid 7, 549 (1946-1948)
- 128) J.CARLES u. R.PECH, C.R.hebd.Seances Acad.Sci. 251, 2764 (1960)
- 129) J.MASQUELIER zit.nach FAIRBAIRN J.W., "The Pharmacology of Plant Phenolics" Acad.Press Ltd. London (1959)
- 130) T.MANDRIK, Mikrobiol.J.(Kiew) 45, 66 (1953)
- 131) S.KURODA, CA 48, 12184 (1954)
- 132) G.J.MARTIN, J.CARLEY jr. u. J.N.MOSS, Exp.Med.Surg. 7, 391 (1948)
- 133) P.K.BOSE, J.Ind.Chem.Soc. 35, 305 (1958)
- 134) CH.GREBUS, M.AUBERT-MINAGLOU u. A.BORIS, Trav.Soc.Pharm. 22, (1), 65 (1962); CA: 59, 920 (1964)
- 135) F.FUJIKAWA, J.Pharm.Soc.Japan 73, 250 (1953)
- 136) E.SENIG, Zentr.Bakteriol.Parasitenk., Abt.II, 117, (1), 13 (1963)
- 137) O.L.OZERESKOVSKAYA, Prikl.Biokhim.Mikrobiol. 4, (6), 698 (1968)
- 138) V.DADAK, Pharmazie 22, 47 (1967)
- 139) J.LEDERBERG, J.Bacteriol. 63, 399 (1952)
- 140) PETRAGNANI, Boll.Ist.sieroterap. milanese 1926, Vol.5, H.3, ref.Zbl.ges.TbK.-forsch.1927, 26: 703
KIRCHNER, Zbl.Bakt.I, Orig. 1932, 124: 403
- 141) H.W.BERSCH u. W.DÖPP, Arzneim.Forsch. 5, 116 (1955)
- 142) F.FUJIKAWA, K.NAKAJIAMA, O.WADAI, M.TORII, SH.NAKAZAWA, T.OMATSU u. T.TOYODA, J.Pharm.Soc.Japan. 73, 250 (1953)
- 143) P.DUQUENOIS, Bull.soc.pharm.Bordeaux 94, 156 (1955)
- 144) P.DUQUENOIS, E.GREIB, Ann.pharm.franc. 14, 685 (1956)
- 145) P.DUQUENOIS, Bull.soc.pharm.Bordeaux 94, 156 (1955)
- 146) R.F.WEISS, "Lehrbuch der Phytotherapie", Hippokrates-Verlag Stuttgart (1960)
- 147) B.KOBER, Münchner Med.Wschr. 97, 767 (1955)
- 148) S.M.PATRIDGE, Nature 167, 443 (1949)
- 149) J.W.CLARK-LEWIS u. P.J.MORTIMER, J.chem.Soc. 4106 (1960)
- 150) D.E.HATHWAY, J.chem.Soc. 520 (1958)
- 151) D.B.MULLIK u. V.C.BRINK, J.Chromatog. 28, 471 (1967)
- 152) P.DIESEL, Diss. in Vorbereitung, München 1974
- 153) Privatmitteilg. von H.JORK, Univ.Saarland, Saarbrücken, H.G.MEUBEN, Nattermann A.G., Köln
- 154) H.JÄGER, Arch.Pharm. 288, 145 (1955)
- 155) E.STAHL, "Dünnschichtchromatographie", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1967
- 156) M.BARCZAI u. F.KÖRÖSY, Nature 165, 369 (1950)
- 157) E.RÖMHILD, Diss. in Vorbereitung, München 1974

L e b e n s l a u f

Am 20. Februar 1945 wurde ich als Tochter des Dr.med. Oswald Blatt und seiner Ehefrau Ursula geb. Exner in Burgellern/Bamberg geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Erlangen und Bayreuth von 1951 bis 1955 und der Oberschule in Bayreuth und Lindenberg/Allgäu von 1955 bis 1964 legte ich an der Oberrealschule Lindenberg 1964 die Reifeprüfung ab.

Die vorgeschriebene Praktikantenzeit für Apotheker absolvierte ich in der Steig-Apotheke Lindau/Bodensee.

Nach einem dreisemestrigen Studium der Naturwissenschaften an der Ludwig-Maximilians-Universität München begann ich im Sommer-Semster 1968 mit dem Studium der Pharmazie. Im Mai 1971 legte ich das Pharmazeutische Staatsexamen ab und erhielt im Oktober 1971 die Approbation als Apotheker.

Im Juni 1971 begann ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner mit vorliegender Arbeit, die zunächst durch ein Promotionsstipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz finanziert wurde. Von Februar 1972 bis Dezember 1972 führte ich meine Arbeit in Südafrika an der Orange-Free-State-Universität Bloemfontein unter Professor Dr. D. Roux weiter.

Seit Januar 1973 bin ich Verwalterin der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, an dem ich im Sommer-Semester 1974 vorliegende Promotionsarbeit abschloß.

THE HISTORY OF THE
CITY OF BOSTON

From the first settlement of the city in 1630 to the present time, the history of Boston is a record of the growth of a great city, and of the development of a great Commonwealth.

The city of Boston was founded in 1630, and has since that time been the seat of government, commerce, and industry. It has been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution.

The city of Boston has been the seat of the Commonwealth of Massachusetts since 1780, and has since that time been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution.

The city of Boston has been the seat of the Commonwealth of Massachusetts since 1780, and has since that time been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution. It has been the seat of the Commonwealth of Massachusetts since 1780, and has since that time been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution.

The city of Boston has been the seat of the Commonwealth of Massachusetts since 1780, and has since that time been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution. It has been the seat of the Commonwealth of Massachusetts since 1780, and has since that time been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution.

The city of Boston has been the seat of the Commonwealth of Massachusetts since 1780, and has since that time been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution. It has been the seat of the Commonwealth of Massachusetts since 1780, and has since that time been the center of the New England movement, and the birthplace of the American Revolution.

